

(19) 世界的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年12月6日 (06.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/92508 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, 5/10, A61K 35/76, 48/00
// (C12N 15/09, C12R 1:92) (C12N 5/10, C12R 1:91)

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04659

(22) 国際出願日: 2001年6月1日 (01.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

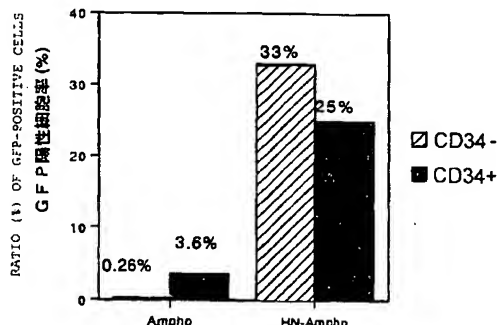
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-169090 2000年6月1日 (01.06.2000) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)
[JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番
11号 Ibaraki (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 米満吉和
(YONEMITSU, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒813-0043 福岡
県福岡市東区名島5-31-3 Fukuoka (JP). 中島俊洋
(NAKAJIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒666-0152 兵庫県
川西市丸山台3-1-25 Hyogo (JP). 中丸健治 (NAKA-
MARU, Kenji) [JP/JP]; 〒140-0001 東京都品川区北
品川3-9-36 三共株式会社品川寮206号室 Tokyo (JP).
小林雅典 (KOBAYASHI, Masanori) [JP/JP]. 長谷川
護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]. 上田泰次 (UEDA,Yasuji) [JP/JP]. 飯田章博 (IIDA, Akihiro) [JP/JP]. 榎原
裕幸 (SAKAKIBARA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒305-0856
茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディ
ナベック研究所内 Ibaraki (JP).(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Ibaraki (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:
— 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。(54) Title: PSEUDO-TYPE RETROVIRUS VECTOR CONTAINING MEMBRANE PROTEIN HAVING HEMAGGLUTININ
ACTIVITY

(54) 発明の名称: ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクター

(57) Abstract: A retrovirus vector containing a membrane protein hav-
ing a hemagglutinin activity. By using the membrane protein having a
hemagglutinin activity, the retrovirus vector of the pseudo-type is con-
structed. This virus vector shows a high gene transfer efficiency into host
cells. It is clarified that genes can be transferred thereby at a high effi-
ciency into cells into which genes can be hardly transferred by the con-
ventional techniques, for example, blood cells and hematopoietic cells
involving hematopoietic stem cells and mucous cells involving mucosa
epithelial cells. This virus vector is highly useful as a vector for gene
therapy.

WO 01/92508 A1

BEST AVAILABLE COPY [続葉有]



(57) 要約:

本発明は、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含むレトロウイルスベクターを提供する。本発明者らは、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質によりシェードタイプ化されたレトロウイルスベクターを構築した。該ウイルスベクターは、宿主細胞への高い遺伝子導入効率を示した。特に、造血幹細胞を含む血球系・造血系細胞、および粘膜上皮細胞を含む粘液を有する細胞などの、従来では遺伝子導入が困難であった細胞に対して高率で遺伝子を導入できることが示された。本発明のウイルスベクターは遺伝子治療用ベクターとして極めて有用である。

明細書

ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプ
レトロウイルスベクター

技術分野

本発明は、パラミクソウイルスのHN蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクターに関する。

背景技術

研究目的や遺伝子治療などにおいて外来遺伝子を標的細胞で発現させるために、レトロウイルスベクターが用いられている。レトロウイルスベクターは比較的容易に製造することが可能であり、導入遺伝子を宿主の染色体に組み込むことができるなどの利点を持っている。レトロウイルスベクターの感染には、一般にウイルスのエンベロープに存在するウイルス蛋白質が重要な役割を果たしている。これまで、レトロウイルスベクターのエンベロープ蛋白質を改変することにより、感染可能な宿主細胞を拡大させたり、または特異的な細胞にのみ感染するウイルスの開発が試みられてきた。

例えば、より広い宿主細胞に対して高い感染性を実現するために、レトロウイルスベクターのエンベロープにVSV-G蛋白質を組み込む系が開発されている (H. Yu et al., 1999, Gene Therapy, 6, 1876-1883)。VSV-Gは、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus) のエンベロープ表面に発現する蛋白質であり、非常に広い宿主細胞に対して感染性を示す。これ以外にも、例えばセンダイウイルス (Sendai virus) のF蛋白質をエンベロープ蛋白質として用いる試みも行われている。F蛋白質によりシュードタイプ化されたレトロウイルスは、アシアログリコプロテイン受容体陽性細胞に対し特異的な感染性を示した (M. Spiegel

et al., 1998, Hepatology, 28, 1429-1429; M. Spiegel et al., 1998, J. Virology, 72, 5296-5302)。

しかし、このような従来のシュードタイプレトロウイルスにおいても、様々な組織や細胞に対し十分な感染性を実現できてはいない。例えば、造血幹細胞をはじめとする各種の幹細胞は、遺伝子治療などにおける標的細胞として重要である（花園豊、Molecular Medicine, Vol.36, No.7, 1999）が、幹細胞の多くは非分裂状態にあり（Abkowitz, J. L. et al., Nat Med, 2(2), 190-7, 1996）、非分裂細胞に対する感染効率が低いレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入は一般に困難である。また、従来の技術を用いたベクターシステムでは、肺の気道粘膜上皮細胞など、細胞外マトリックスに富んだ細胞への遺伝子導入は困難であった。これらの細胞に対して遺伝子を導入する場合、粘液などの細胞外マトリックスを洗浄して物理的に除去する方法が試みられている。しかしこの方法は煩雑であり、組織を傷つける危険が存在する。

発明の開示

本発明は、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクターを提供することを課題とする。

本発明者らは、レトロウイルスをシュードタイプ化するための蛋白質として、ヘマグルチニン活性を持つ蛋白質を選択した。ヘマグルチニン(hemagglutinin, HAin; 赤血球凝集素)とはヘマグルチネーション(Hemagglutination, HA; 赤血球凝集反応)を起す蛋白質であり、多くのウイルスがこの活性を有することが知られている。本発明者らは、ヘマグルチニン活性を持つ膜蛋白質をエンベロープに含むレトロウイルスを作製することにより、様々なタイプの細胞や組織に対して高い遺伝子導入力を有するレトロウイルスベクターを構築することができると考えた。このようなレトロウイルスを製造するため、本発明者らは、広い宿主域を有するパラミクソウイルスのエンベロープ蛋白質を用いた。まず、センダイウ

イルス (SeV) のエンベロープ蛋白質を発現するベクターを利用して、マウスレトロウイルス由来のウイルスベクターをSeV Fおよび/またはHN蛋白質でシュードタイプ化した。具体的には、マウス幹細胞ウイルス (MSCV) を材料に、エコトロピックエンベロープ蛋白またはアンフォトロピックエンベロープ蛋白に加え、SeVのFおよび/またはHN蛋白を持つレトロウイルスを構築し、ヒト細胞に対する遺伝子導入効率を調べた (実施例 1 および 2)。

ヒトの細胞に感染性のないエンベロープ蛋白質であるエコトロピックエンベロープ蛋白によりパッケージングを行った場合、F蛋白或いはHN蛋白単独でシュードタイプ化したウイルスはヒト細胞への遺伝子導入は認められなかったが、F蛋白とHN蛋白を同時に発現させてシュードタイプ化したウイルスでは本来感染性のないヒト細胞への遺伝子導入が認められた (図 1 Eco)。この結果からセンダイウイルス以外のウイルス由来のベクターをセンダイウイルスのF蛋白とHN蛋白でシュードタイプ化することによりそのウイルスベクターの感染宿主域を拡大しうることが明らかとなった。

ヒトの細胞に感染性をもつエンベロープ蛋白質であるアンフォトロピックエンベロープ蛋白によってパッケージングを行った場合、HN蛋白単独、或いはF蛋白とHN蛋白を同時に発現させてシュードタイプ化させた場合のどちらにおいても、遺伝子導入効率が著しく向上することが明らかとなった (図 1 Ampho)。この結果からレトロウイルスベクターをセンダイウイルスHN蛋白単独でもシュードタイプ化しうること、センダイウイルスHN蛋白単独によるシュードタイプ化或いはセンダイウイルスF蛋白とHN蛋白でシュードタイプ化することによりレトロウイルスベクターの遺伝子導入効率を向上しうることが明らかとなった。

本発明者らは、また、HN蛋白でシュードタイプ化したアンフォトロピックレトロウイルスベクターを生産し、造血幹細胞を含むヒト骨髓細胞に対する遺伝子導入効率を検討した (実施例 3)。ヒト骨髓CD34陽性細胞にHN蛋白でシュードタイプ化したベクターを感染させ、フローサイトメーターによりCD34をマーカーにして

細胞を分画して遺伝子が導入された細胞を検出したところ、HN蛋白によるシュードタイプ化により、CD34陽性細胞およびCD34陰性細胞共に遺伝子導入の効率が著しく上昇することが判明した(図3)。CD34陽性細胞は造血幹細胞を含む細胞分画と言われており、HN蛋白によるシュードタイプ化が造血幹細胞を含む血球系・造血系細胞への遺伝子導入にも有効であることが示された。

本発明者らは次に、レトロウイルスの中でも遺伝子治療ベクターとしての利用が期待されているレンチウイルスを用いて、パラミクソウイルスのF蛋白質および/またはHN蛋白質でシュードタイプ化したベクターの構築を行った。レンチウイルスとしては、遺伝子治療の分野において従来から用いられてきたヒト免疫不全ウイルス(HIV)と比較して、安全性が高いなど様々な利点を有するサル免疫不全ウイルス(SIV)を用いた(実施例5)。センダイウイルス(SeV)からエンベロープを再構成させたビロソームまたは不活化センダイウイルスを調製し、これらを、VSV-G蛋白でシュードタイプ化されているSIVと融合させてSeVのエンベロープ蛋白質を持つSIVウイルスを作製した。このウイルスをヒト細胞と共にインキュベートし、ベクターの感染効率を検証した(実施例6および7)。その結果、VSV-G蛋白でシュードタイプ化されたSIVの場合と比べ、SeVのエンベロープを融合させたSIVはより高い感染効率を示すことが判明した(図8)。感染効率の上昇には、センダイウイルスのHN蛋白の寄与が高いことが示唆された。

SeVのエンベロープ蛋白の寄与を詳しく調べるため、本発明者らはFHNビロソーム、Fビロソーム、およびHNビロソームを調製し、それぞれをVSV-Gシュードタイプ化SIVと融合させたベクターを作製し、その感染実験を行った(実施例7)。FHNビロソームを融合させたベクターは、SIV単独よりも有意に高い遺伝子導入効率を示した(図10)。HNビロソームを用いた場合にも遺伝子導入効率の上昇が認められたが、Fビロソームを融合させた場合は、FHNビロソームで認められたような遺伝子発現の上昇は得られず、遺伝子導入効率の上昇にはHN蛋白質が重要であることが裏付けられた。

本発明者らはさらに、SeVのエンベロープ蛋白質の発現ベクターを用いて、パッケージングの段階でSeVのエンベロープ蛋白によりシュードタイプ化されたレンチウイルスベクターの製造を行った（実施例8）。VSV-G蛋白に加え、F蛋白およびHN蛋白でシュードタイプ化されたSIVベクターは高い力価で産生され、このウイルスベクターは遠心によりさらに濃縮することが可能であった。本発明者らは、このベクターを用いてインビボにおける遺伝子導入試験を行った。

気管上皮粘膜細胞は、従来のウイルスベクターでは遺伝子導入が困難であり、導入に際して物理的障害を取り除く処理がされており、例えばVSV-GシュードタイプHIVベクターを用いた遺伝子導入では二酸化硫黄などにより傷害しないと十分な導入効果が認められていない（L. G. Johnson et al., Gene Therapy, 7, 568-574, 2000）。VSV-G蛋白、並びにセンダイウイルスのFおよびHN蛋白によりシュードタイプ化したSIVベクターが、傷害を与える必要なく気管上皮粘膜細胞に効率よく遺伝子を導入できるかを検討した（実施例9）。GFPを発現する上記のシュードタイプSIVベクターをマウスに経鼻的に投与し、3日目の気管の組織切片におけるGFP蛋白を観察したところ、気管上皮細胞にGFPの蛍光が観察された（図11）。また、同じ個体の鼻中隔粘膜においても粘膜上皮に発現が観察され、多列線毛上皮にもGFPの蛍光が認められた（図12）。このように、本発明のウイルスベクターは、粘膜上皮などの粘液を有する細胞に対しても、細胞や組織を傷害することなく遺伝子を導入できることが証明された。

さらに本発明者らは、HN蛋白質の細胞質領域を改変した蛋白質を発現するベクターを構築し、これを用いて新たなシュードタイプ化ウイルスベクターの産生を行った。具体的には、SIVエンベロープ蛋白質の細胞質領域をSeV HN蛋白質に付加、またはHN蛋白質の細胞質領域をSIVエンベロープ蛋白質の細胞質領域に置換した蛋白質、さらにSeV F蛋白質の細胞質領域の全部または一部を欠失またはSIVエンベロープ蛋白質の細胞質領域に置換した蛋白質を発現するベクターを構築し、これらの蛋白質を有するシュードタイプ化SIVベクターを構築した（実施例11～1

2)。その結果、これらのベクターは、293T細胞やBEAS-2B細胞などのヒト細胞に遺伝子導入する能力を有しており、HNシュードタイプ化ベクターが、VSV-Gなどの他のエンベロープ蛋白質を共存させることなしにヒト細胞へ遺伝子を導入し得ることが判明した。また、これらの改変HN蛋白質発現プラスミドを用いて構築した、MSCV をベースとしたシュードタイプレトロウイルスベクターは、ヒト細胞に対して遺伝子を導入できることが明らかとなった（実施例13）。改変HN蛋白質を有するシュードタイプ化SIVベクターを大量調製・濃縮し、ヒト骨髓細胞へ感染させたところ、CD34⁺ 骨髓細胞に高い効率で遺伝子を導入できることが判明した（実施例14）。

さらに本発明者らは、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）蛋白質の発現ベクターを用いて、HAシュードタイプ化レンチウイルスベクターを作製した。得られたウイルスはヒト細胞に遺伝子を導入する能力を有しており、遠心による高度の濃縮が可能であった（実施例16）。また、インフルエンザウイルスHA蛋白質とセンダイウイルスHN改変蛋白質とを有するHA/HNシュードタイプ化レンチウイルスベクターを作製し、このベクターがヒト細胞に遺伝子を導入する能力を有することを確認した（実施例17）

以上のように、本発明者らは、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質によりレトロウイルスをシュードタイプ化することにより、高い遺伝子導入効率を有するウイルスベクターを構築することに成功した。さらに該ウイルスベクターが、造血幹細胞を含む血球系および造血系細胞、および粘膜上皮細胞などの粘液を有する細胞に対し、エキスピボまたはインピボ投与において高い効率で遺伝子を導入できることを証明した。

本発明は、より詳しくは、

- (1) ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含む、実質的に純粋なシュードタイプレトロウイルスベクター、
- (2) ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質が一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスに

含まれるヘマグルチニン活性を有する蛋白質に由来する、(1)に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(3) ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質がパラミクソウイルスのHN蛋白質および/またはオルトミクソウイルスHA蛋白質に由来する、(2)に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(4) ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質が一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスに含まれるヘマグルチニン活性を有する蛋白質の細胞質側領域の一部または全部が置換、欠失、および/または付加により改変された蛋白質である、(2)に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(5) パラミクソウイルスのF蛋白質をさらに含む、(1)から(3)のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(6) 該F蛋白質の細胞質側領域の一部または全部が欠失および/または付加により改変されている、(5)に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(7) ヒト細胞に感染するウイルスに由来するエンベロップ蛋白質をさらに含む、(1)から(6)のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(8) レトロウイルス由来のアンフォトロピックエンベロップ蛋白質を含む、(7)に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(9) 水疱性口内炎ウイルス由来のVSV-G蛋白質を含む、(7)または(8)に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(10) レトロウイルスベクターがオンコウイルスに由来する、(1)から(9)のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(11) レトロウイルスベクターがレンチウイルスに由来する、(1)から(9)のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(12) レンチウイルスがサル免疫不全ウイルスに由来する、(11)に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(13) パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、(3)または(5)に記

載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(14) 外来遺伝子を発現可能に含む、(1) から (13) のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(15) 粘液を有する細胞への遺伝子導入用である、(14) に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(16) 粘液を有する細胞が粘膜上皮細胞である、(15) に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(17) 粘膜上皮細胞が鼻腔または肺の気管支の粘膜上皮細胞である、(16) に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(18) 血球系または造血系細胞への遺伝子導入用である、(14) に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(19) 血球系または造血系細胞が造血幹細胞である、(18) に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター、

(20) (14) から (19) のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクターを含む遺伝子導入用組成物、

(21) 医薬である、(20) に記載の組成物、

(22) (14) から (19) のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクターを細胞に接触させる工程を含む、外来遺伝子を細胞に導入する方法、

(23) ヘマグルチニン活性を有する蛋白質をコードするDNAを発現可能に含む、(1) から (19) のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクターの産生用パッケージング細胞、

(24) (1) から (19) のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクターの製造方法であって、(23) に記載のパッケージング細胞内でレトロウイルス由来のジーントランスファーベクターDNAを転写させる工程を含む方法、に関する。

本発明のレトロウイルスベクターは、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質に

よりシュードタイプ化されていることを特徴とする、実質的に純粋なシュードタイプレトロウイルスベクターである。本発明において「ウイルスベクター」とは、宿主内に核酸分子を導入する能力を有するウイルス粒子を指す。「レトロウイルスベクター」とは、ベクターがレトロウイルスのバックボーンを有することを指す。「レトロウイルスのバックボーンを有する」とは、該ベクターを構成するウイルス粒子に含まれる核酸分子がレトロウイルスゲノムに基づくことを言う。例えば、ウイルス粒子に含まれる核酸分子がレトロウイルスゲノム由来のパッケージングシグナル配列を有するベクターは、本発明においてレトロウイルスベクターに含まれる。

「ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質によりシュードタイプ化されているレトロウイルスベクター」とは、該レトロウイルスベクターの天然型が保持していない1つまたはそれ以上のヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を保持しているレトロウイルスベクターをいう。本発明において「実質的に純粋なシュードタイプレトロウイルスベクター」とは、該シュードタイプレトロウイルスベクターが、レトロウイルス以外のヘマグルチニン活性を持つ複製型ウイルスを実質的に有さないことを指す。本発明のシュードタイプレトロウイルスベクターとしては、レトロウイルス以外の複製能を有するウイルスを実質的に有さないことが好ましい。複製能を有するとは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。例えば、シュードタイプレトロウイルスベクターを感染させた細胞において、ベクターの感染後にヘマグルチニン活性を表すHA価（赤血球凝集反応）が感染初期の値より有意に上昇しなければ、このベクターは、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を持つ複製能を有するウイルスを実質的に有しないと判定される。

ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質としては、天然の蛋白質であるか人工的な蛋白質であるかは特に制限されないが、ウイルスが持つヘマグルチニン活性を有する蛋白質が好適である。これまでに様々なウイルスにおいてヘマグルチニン

活性が検出されている。ヘマグルチニン活性の検出に用いられる赤血球の種類および反応の至適温度は、各ウイルスによって様々である。また、風疹ウイルスなどにおいては、反応にカルシウムイオンが必要であると言われている。アルボウイルスにおいては、反応の至適pHは厳密である。ウイルスのヘマグルチニンとしては、エンテロ、風疹ウイルスなどではビリオンそのもの、アルボ、アデノなどではビリオン以外にもビリオンより小さい粒子としても存在する。ポックスウイルスのヘマグルチニンはビリオンとは別の脂質を含む粒子として存在する。本発明のシュードタイプレトロウイルスにおいては、このような蛋白質を含むものであってもよい。アデノIII亜群のウイルスなどは、ラットの赤血球を部分凝集させる不完全凝集を起すが、このような蛋白質もヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質として用いることができる。

ヘマグルチニン活性（赤血球凝集反応；HA価）は公知の方法により試験することができる（国立予防衛生研究所学友会編，改訂二版 ウイルス実験学 総論，pp. 214-225，丸善株式会社）。赤血球としては、例えばニワトリ（ヒヨコおよび成鶏を含む）、ガチョウ、ラット、モルモット、アカゲザル、ミドリザル、またはヒトなどの赤血球が用いられ得る。反応温度は、0℃、4℃、室温、または37℃など、蛋白質により適した条件で行う。各ウイルスの赤血球凝集反応の反応条件の例を以下に示す。

表 1

ウイルスの種類			H A 反 応		
			赤 血 球	温 度	pH
ア デ ノ	I 亜群	3, 7, 11, 14, 16, 20, 21, 25, 28	アカゲザル	37°C	非 依 存
	II 亜群	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27	ラ ッ ト		
	III 亜群	1, 2, 4, 5, 6	ラ ッ ト 不完全凝集		
エ ン テ ロ	コ ク サ ッ キ ー	A 7	ニワトリ	室 温	非 依 存
		A 20, 21, 24	ヒ ト O 型	4°C	
		B 1, 3, 5		37°C	
	エ コ ー	3, 6, 7, 11, 12, 13, 19, 20, 21, 24, 29		4°C	
レ オ	1		ヒ ト O 型	室 温	非 依 存
	2				
	3		ウ シ		
ミ シ ソ	イ ン フ エ ル ザ	A	ニワトリ, ヒトまたは モルモット	室 温	7.2
		B			
		C	ニワトリ	4°C	
	お た ふ く		ニワトリ	室 温	
	ニューカッスル病 (NDV)				
	パ フ ラ ル イ ン ザ	1	ニワトリま たはヒト	4°C	非 依 存
		2	ニワトリ		
		3	ヒトまたは モルモット	4°Cま たは室温	
	は し か		ミドリザル	37°C	
ア ル ボ			ガチョウま たはヒヨコ	37°C	酸性側厳密
ラ ブ ド	狂 犬 病		ガ チ ョ ウ	0°C	6.4 厳密
	水疱性口内炎 (VSV)				5.8 厳密
ボ ッ ク ス	ワクチニア, 痘そう		ニワトリ	室温ま たは37°C	非 依 存
風 疹			ヒヨコま たはガチョウ	4°C	6.2 ま たは 7.2
ポ リ オ ー マ			モルモット	4°C	7.2
ラ ッ ト (RV)			モルモット	室 温	7.2

本発明シュードタイプレトロウイルスに含まれるヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質としては、特にウイルス蛋白に由来する蛋白質が好ましく、このような

蛋白質としては、具体的には、パラミクソウイルスのHN蛋白質、オルソミクソウイルスのHA蛋白質、インフルエンザウイルスのHA蛋白質、トガウイルスのE1蛋白質、ワクシニアウイルスのA27L、H3L、D8L蛋白質、フラビウイルスのM、E蛋白質、コロナウイルスのE1、E2蛋白質、ブニヤウイルスのG1蛋白質などが挙げられる。中でも、本発明シュードタイプレトロウイルスに含まれるヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質としては、一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスが有する蛋白質が好ましく、特にパラミクソウイルスのHN蛋白質が好ましい。

本発明において「一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルス」とは、一本鎖ネガティブ鎖[すなわち(-)鎖] RNAをゲノムに有するウイルスを言う。このようなウイルスとしては、パラミクソウイルス (Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, および Pneumovirus属等を含む)、ラブドウイルス (Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む)、フィロウイルス (Firoviridae)、オルトミクソウイルス (Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like viruses属等を含む)、ブニヤウイルス (Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, および Phlebovirus属等を含む)、アレナウイルス (Arenaviridae) などの科に属するウイルスが含まれる。

本発明において「パラミクソウイルス」とは、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) に属するウイルスを指す。パラミクソウイルスとしては、例えばセンダイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンパーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1, 2, 3型等が挙げられる。センダイウイルスは、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などが含まれる。DI粒子 (J. Virol. 68, 8413-8417(1994)) 等の不完全ウイルスや、合成したオ

リゴヌクレオチド等も、本発明のワクチンを製造するための材料として使用することができる。HN蛋白質はパラミクソウイルスが持つウイルス蛋白の1つである。パラミクソウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子が知られている。「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある。

パラミクソウイルス属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルブラウイルス属	NP	P/V	M	F	HN (SH)		L
モービリウイルス属	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のパラミクソウイルス属 (Paramyxovirus) に分類されるセンドライウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886を参照のこと。

例えば、パラミクソウイルスのエンベロープ蛋白質によりシュードタイプ化されたレトロウイルスベクターは、例えば実施例に記載されたように、不活化パラミクソウイルス、またはパラミクソウイルスのエンベロープ蛋白質を持つピロソームなどを調製し、これをレトロウイルスに融合させることにより製造すること

ができる。また、パラミクソウイルスのエンベロープ蛋白質を発現する発現ベクターを、レトロウイルスのパッケージング細胞で発現させることにより製造することができる。

本発明のシュードタイプレトロウイルスベクターは、例えばパラミクソウイルスのHN蛋白質などのヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質に加えてパラミクソウイルスのF蛋白質をさらに含むことができる。本発明において、HNおよびF蛋白を持つシュードタイプレトロウイルスベクターが、高い遺伝子導入効率を示すことが実証された。本発明には、このFおよびHN蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクターが含まれる。また、本発明のシュードタイプレトロウイルスベクターは、パラミクソウイルスのM蛋白質をさらに含んでもよい。

さらに、本発明のシュードタイプレトロウイルスベクターは、他のウイルス由来のエンベロープ蛋白質をさらに含むことができる。例えば、このような蛋白質として、ヒト細胞に感染するウイルスに由来するエンベロープ蛋白質が好適である。このような蛋白質としては、特に制限はないが、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質、水疱性口内炎ウイルス（VSV）のG蛋白質などが挙げられる。また、ヘルペスウイルス科の蛋白質としては、例えば単純ヘルペスウイルスのgB、gD、gH、gp85蛋白質、EBウイルスのgp350、gp220蛋白質などが挙げられる。ヘパドナウイルス科の蛋白質としては、B型肝炎ウイルスのS蛋白質などが挙げられる。

例えば、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ（アンフォトロピックenv）蛋白質およびHN蛋白質を含むベクターは、本発明のベクターとして好適である。また、例えば水疱性口内炎ウイルス（Vesicular stomatitis virus; VSV）の表面糖蛋白質であるVSV-G蛋白質を含むことができる。VSV-Gはほとんどの動物細胞に存在するリン脂質をレセプターとしており、VSV-G蛋白質およびHN蛋白質を含むベクターを用いることにより遺伝子導入できる細胞種が飛躍的に増え、導入効率も上昇する。実際、VSV-G蛋白質およびHN蛋白質を含むベ

クターは、VSV-G単独を有するベクターよりも高い遺伝子導入効率を示した。従って、VSV-G蛋白質およびHN蛋白質を含むベクターは本発明のベクターとして好適である。これらのベクターは、さらにパラミクソウイルスのF蛋白質を含むことができる。すなわち、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質、F蛋白質、およびHN蛋白質を含むベクター、並びにVSV-G蛋白質、F蛋白質、およびHN蛋白質を含むベクターは本発明に含まれる。さらに、これらのベクターは、パラミクソウイルスのM蛋白質を含むことができる。すなわち、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質、F蛋白質、HN蛋白質、およびM蛋白質を含むベクター、並びにVSV-G蛋白質、F蛋白質、HN蛋白質、およびM蛋白質を含むベクターは本発明に含まれる。上記のような、パラミクソウイルス由来のFおよびHN蛋白質を含むベクター、並びにF、HNおよびM蛋白質を含むベクターは、粘液を有する細胞や造血幹細胞を含む細胞分画など、従来では遺伝子の導入が困難であった細胞に対しても高い遺伝子導入能を示した。

VSV-G蛋白質は1種類の糖蛋白が安定な3量体を形成して膜上に存在するため、精製過程でのベクター粒子の破壊が起こりにくく、遠心による高濃度の濃縮が可能となる (Yang, Y. et al., Hum Gene Ther: Sep, 6(9), 1203-13. 1995)。本発明者らはVSV-G、およびF、HNでシュードタイプ化したSIVベクターが遠心濃縮可能であることを確認した。

ベクターのシュードタイプ化のために用いるパラミクソウイルスのHN、F、およびM蛋白質としては特に制限はない。特に、センダイウイルスを含むレスピロウイルス属の蛋白質は好適に用いられ得る。センダイウイルスのHN、F、およびM蛋白質としては、例えばZ株由来の蛋白質を用いることができる。また、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質としては、例えばマウス白血病ウイルス (MuLV) 4070A株由来のエンベロープ蛋白質を用い得る。また、MuMLV 10A1由来のエンベロープ蛋白質を用いることもできる (例えばpCL-10A1 (Imgenex) (Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996))). エコトロピックエン

ベロープ蛋白質としては、例えばモロニーマウス白血病ウイルス (MoMuLV) 由来のエンベロープ蛋白質を用いることができる。水疱性口内炎ウイルスG蛋白 (VSV-G) としては、例えば Indiana血清型株 (J. Virology 39: 519-528 (1981)) 由来の蛋白を用いることができる。これら以外にも、所望の株由来の蛋白質を用いることができる。

HN、F、M、VSV-G、およびレトロウイルスエンベロープ蛋白質など、上記のエンベロープ蛋白質は、野生型ウイルスが持つインタクトな蛋白質であってもよいし、天然または人為的に変異が導入されていてもよい。例えば、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミニダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、HN蛋白質による感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用して抗原提示能を弱めた蛋白質を用いて本発明のシュードタイプレトロウイルスを作成することも可能である。また、病原性パラミクソウイルス等における弱毒株由来のエンベロープ蛋白質などを用いることもできる。

例えば、ヘマグルチニン活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質や、他のエンベロープ蛋白質の細胞質側領域を欠失、置換、および/または付加により改変した蛋白質を用いて本発明のレトロウイルスベクターをシュードタイプ化することにより、より高い遺伝子導入能を有するベクターを製造することが可能である。本発明は、天然に存在するヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質の細胞質側領域の一部または全部が、置換、欠失、および/または付加により改変された蛋白質を含む、シュードタイプレトロウイルスベクターに関する。具体的には、例えばパラミクソウイルスのHN蛋白質および/またはF蛋白質の細胞質側領域を欠失させた

り、他の膜蛋白質（例えばレンチウイルスを含むレトロウイルスのエンベロープ蛋白質）の細胞質側領域で置換または付加した改変蛋白質は、感染効率の高いウイルスベクターを製造するために好適に用いられる。本発明は、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質であって、該蛋白質の天然型の細胞質側領域の一部または全部が、置換、欠失、および/または付加により改変されている蛋白質、およびこの蛋白質をコードする核酸（DNAまたはRNAなど）を提供する。特に本発明は、ウイルスが有するヘマグルチニン蛋白質の細胞質側領域が、置換、欠失、および/または付加により改変されている蛋白質、およびこの蛋白質をコードする核酸を提供する。例えば、配列番号：40または41に記載のアミノ酸配列を含む改変HN蛋白質は好適である。これらの改変蛋白質および該蛋白質をコードする核酸は、本発明のシュードタイプ化ウイルスの製造のために有用である。

具体的には、パラミクソウイルスのHN蛋白質の細胞質側領域を、SIV等のレンチウイルスまたはレトロウイルスのエンベロープ蛋白質の細胞質側領域に置換した蛋白質（例えば実施例11に記載のpCAGGS-SIVct/HNがコードする蛋白質）、およびパラミクソウイルスのHN蛋白質にレンチウイルス等のレトロウイルスのエンベロープ蛋白質の細胞質側領域を付加した蛋白質（例えば実施例11に記載のpCAGGS-SIVct+HN）などでレトロウイルスをシュードタイプ化することにより、ヒト細胞を含む広い細胞に高率で外来遺伝子を導入することが可能となる。HN蛋白質において欠失させる細胞質側領域の範囲、および付加されるレトロウイルスのエンベロープ蛋白質の細胞質側領域の範囲は特に制限はなく、細胞質側領域の一部または全部を欠失、置換、および/または付加させることができる。

このようなウイルスベクターは、さらにパラミクソウイルスの改変されたF蛋白質を含むことができる。例えば、パラミクソウイルスのF蛋白質の細胞質側領域を欠失させた蛋白質、および、このような欠失蛋白質にSIV等のレンチウイルスまたはレトロウイルスのエンベロープ蛋白質の細胞質側領域を付加した蛋白質などが用いられ得る。具体的には、例えばF蛋白質細胞質側領域のアミノ酸を欠失させた蛋白

質を発現するプラスミドを構築する。欠失させる範囲は特に制限はなく、細胞質側領域の一部または全部を欠失させることができる。センダイウイルスF蛋白質を細胞質側領域を4アミノ酸残した欠失側F蛋白質 (Fct4) を持つシュードタイプウイルスは、有意に高い遺伝子導入効率を示した。従って、0～数個のアミノ酸を残して細胞質側領域を欠失させた蛋白質は、本発明のシュードタイプ化ウイルスの製造に好適と考えられる。これらの欠失型F蛋白質に、他のウイルスエンベロープ蛋白質 (例えばレンチウイルスエンベロープ蛋白質) の細胞質側領域の一部または全部を付加することにより、F蛋白質の細胞質側領域を他のペプチドに置換した蛋白質を製造することができる。例えば、SIVのエンベロープ蛋白質の細胞質側領域の5'側より11アミノ酸 (SIVct11) を付加した蛋白質などを例示することができる。このように本発明は、パラミクソウイルスのF蛋白質であって、該蛋白質の天然型の細胞質側領域の一部または全部が、置換、欠失、および/または付加により改変されている蛋白質、およびこの蛋白質をコードする核酸を提供する。特に本発明は、F蛋白質の細胞質側領域が、レンチウイルスを含むレトロウイルスのエンベロープ蛋白質の細胞質側領域の一部または全部と置換されている蛋白質、およびこの蛋白質をコードする核酸を提供する。例えば、配列番号：42、43、44、45、46、または47に記載のアミノ酸配列を含む改変F蛋白質は好適である。これらの改変蛋白質および該蛋白質をコードする核酸は、本発明のシュードタイプ化ウイルスの製造のために有用である。

また、ヘマグルチニン活性を有するウイルスのエンベロープ蛋白質として、オルトミクソウイルス科ウイルスのHA蛋白質を用いることも好ましい。例えば、インフルエンザウイルスのエンベロープ蛋白発現プラスミドを用いて製造されたシュードタイプウイルスは、ヒト細胞を含めた広い哺乳動物細胞に感染可能である。インフルエンザウイルスエンベロープには所望の単離株由来のものが用いられ得る。インフルエンザウイルスのbuddingにおいては、ノイラミニダーゼがシアル酸との結合を切断する役割を担っている。このため、HAシュードタイプ作製にお

いてはノイラミニダーゼで処理することで感染性ウイルスを得ることができる。あるいは、ノイラミニダーゼ活性を有する蛋白質を共存させたウイルスベクターを作製することによって、自動的にシアル酸との結合を切断させることができる。この場合、パラミクソウイルスのHN蛋白質などの、ノイラミニダーゼ活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質を用いることが特に好適である。このように本発明は、HA/HN蛋白質でシュードタイプ化されたレトロウイルスベクターを提供する。

本発明のレトロウイルスベクターは、オンコウイルスに由来するものが含まれる。「オンコウイルス」とは、オンコウイルス亜科 (Oncovirus) に属するレトロウイルスを指す。オンコウイルスには、肉腫ウイルス、白血病ウイルス、および乳癌ウイルスなど、発癌に関連するレトロウイルスが含まれる。例えば、モロー Maus 白血病ウイルス (Moloney Murine Leukaemia Virus; MoMLV) は、もっとも初期に開発されたレトロウイルスベクターの1つであり、これまでに多くの改良がなされ広く用いられている。MoMLVをパラミクソウイルスHN蛋白質などのヘマグルチニン活性を有する蛋白質でシュードタイプ化したウイルスベクターは本発明において好適に用いられ得る。また、実施例で用いられたマウス幹細胞ウイルス (Murine Stem Cell Virus; MSCV) も、特に血球系・造血系細胞および胎児性幹細胞などに対する遺伝子導入のためのベクターとして好適である。

また、本発明のレトロウイルスベクターは、レンチウイルスに由来するものが含まれる。レンチウイルスとは、レンチウイルス亜科 (Lentivirus) に属するレトロウイルスを指す。レンチウイルスには、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) (例えばHIV1またはHIV2)、サル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus; SIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、マエディ・ビスナウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV) などが含まれる。本発明のレトロウイルスベクターは、所望の株およびサブタイプに由来するものであってよい。例えば HIV-1としては、全てのメジャー

(M) サブタイプ (AからJを含む)、Nおよび outlier (O) が含まれる (Hu, D. J. et al., JAMA 1996; 275: 210-216; Zhu, T. et al., Nature 1998, 5; 391(667): 594-7; Simon, F. et al., Nat. Med. 1998, 4(9): 1032-7)。SIV単離株としては、SIVagm、SIVcpz、SIVmac、SIVmd、SIVsm、SIVsyk等が例示できる。

レンチウイルスの特徴は、非分裂細胞に対しても感染し、宿主細胞の染色体へウイルスゲノムを組み込む性質を持つことである。これにはgagおよびvprにコードされている核移行シグナルが重要な働きをしているものと考えられている。この性質を利用し、レンチウイルスをベースとした本発明のウイルスベクターを作れば、生体内組織の非分裂細胞、種々の組織の幹細胞のようにほとんど分裂しない細胞へも遺伝子を導入し、長期間の遺伝子発現が可能となると考えられる。

レンチウイルスの中でもっとも早くベクター化の試みが行われたのはヒト免疫不全ウイルスHuman Immunodeficiency Virus (HIV) であり、本発明においても好適に用いられ得る。また、ネコ免疫不全ウイルスFeline Immunodeficiency Virus (FIV) (Poeschla, E. M. et al., Nature Medicine, 4(3), 354-7, 1998) やヤギ関節炎脳炎ウイルスCaprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) (Mselli-Lakhal, L. et al., Arch. Virol., 143(4), 681-95, 1998) をベースとしたベクターの開発が行われている。これらのベクターを本発明のベクターの製造に用いることも可能である。

サル免疫不全ウイルス (Simian Immunodeficiency Virus, SIV) はサルにおけるHIV類似ウイルスとして発見され、HIVとともにPrimates Lentivirusグループを形成している (井戸栄治, 速水正憲, サル免疫不全ウイルスの遺伝子と感染・病原性, 蛋白質 核酸 酵素: Vol. 39, No. 8, 1994)。このグループはさらに大きく4つのグループに分類され、1) ヒトにおいて後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) の原因となるHIV-1とチンパンジーより分離されたSIVcpzを含むHIV-1グループ、2) スーティーマンガベイ *Cercocebus atys* より分離されたSIVsmmとアカゲザル *Macaca mulatta* より分離されたSIVmac、およ

びヒトに対し低頻度ではあるが病原性を示すHIV-2 (Jaffar, S. et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., 16(5), 327-32, 1997)よりなるHIV-2グループ、3)アフリカミドリザル *Cercopithecus aethiops* から分離されたSIVagmに代表されるSIVagmグループ、4)マンドリル *Papio sphinx* から分離されたSIVmndに代表されるSIVmndグループからなっている。

このうち、SIVagmおよびSIVmndでは自然宿主における病原性の報告はなく (Ohta, Y. et al., Int. J. Cancer, 15, 41(1), 115-22, 1988; Miura, T. et al., J. Med. Primatol., 18(3-4), 255-9, 1989; 速水正憲, 日本臨床, 47, 1, 1989)、特に本実施例で用いたSIVagmの一種であるTYO-1株は自然宿主でも、カニクイザル *Macaca fascicularis*、アカゲザル *Macaca mulatta* に対する実験感染でも病原性を示さないことが報告されている (Ali, M. et al, Gene Therapy, 1(6), :367-84, 1994; Honjo, S et al., J. Med. Primatol., 19(1), 9-20, 1990)。SIVagmのヒトに対する感染、発症については報告がなく、ヒトに対する病原性は知られていないが、一般に霊長類におけるレンチウイルスは種特異性が高く、自然宿主から他種に感染、発症した例は少なく、その発症も低頻度あるいは進行が遅いという傾向がある (Novembre, F. J. et al., J. Virol., 71(5), 4086-91, 1997)。従って、SIVagm、特にSIVagm TYO-1をベースとして作製したウイルスベクターは、HIV-1や他のレンチウイルスをベースとしたベクターと比べて安全性が高いと考えられ、本発明において好適に用いられ得る。

また、本発明のレトロウイルスベクターは、スプーマウイルス (Spumavirus) に由来するものが含まれる。スプーマウイルスには、例えばフォーミーウイルス (Foamyvirus) が含まれる (DE4318387; W09607749; Virology (1995) 210, 1, 167-178; J. Virol. (1996) 70, 1, 217-22)。フォーミーウイルスに由来する本発明のベクターは、ヒト細胞への外来遺伝子導入、特に遺伝子治療および組換えワクチンの投与などに利用され得る。

本発明のレトロウイルスベクターとしては、LTR (long terminal repeat) に改

変を加えることもできる。LTRはレトロウイルスに特徴的な配列であり、ウイルスゲノムの両端に存在している。5' LTRはプロモーターとして働き、プロウイルスからのmRNAの転写を促す。したがって、ジーントランスファーベクターの5' LTRのプロモーター活性をもつ部分を別の強力なプロモーターと置換すれば、ジーントランスファーベクターのmRNA転写量が増大し、パッケージング効率が上昇、ベクター力価を上昇させる可能性がある。さらに、例えばレンチウイルスの場合、5' LTRはウイルス蛋白質tatによる転写活性の増強を受けることが知られており、5' LTRをtat蛋白質に依存しないプロモーターに置換することで、パッケージングベクターからtatを削除することが可能となる。また、細胞に感染し細胞内に侵入したウイルスRNAは逆転写された後、両端のLTRを結合させた環状構造となり、結合部位とウイルスのインテグラーゼが共役して細胞の染色体内にインテグレートされる。プロウイルスから転写されるmRNAは5' LTR内の転写開始点より下流、3' LTRのpolyA配列までであり、5' LTRのプロモーター部分はウイルス内にパッケージングされない。したがって、プロモーターを置換したとしても標的細胞の染色体に挿入される部分には変化が無い。以上のことから、5' LTRのプロモーターの置換は、より高力価で安全性の高いベクターを作成することにつながると考えられる。従って、ジーントランスファーベクターの5' 側プロモーターの置換を行い、パッケージングされるベクターの力価を上昇させることができる。

また、3' LTRの配列を部分的に削除し、標的細胞から全長のベクターmRNAが転写されることを防止するSelf Inactivating Vector (SINベクター) (自己不活性化型ベクター) の作成により、安全性を上昇させることも可能である。標的細胞の染色体に侵入したレンチウイルスのプロウイルスは、3' LTRのU3部分を5' 端に結合した形となる。したがってジーントランスファーベクターは、標的細胞の染色体では5' 端にU3が配置され、そこからジーントランスファーベクター全体のRNAが転写されることになる。仮に、標的細胞内にレンチウイルスあるいはその類似の蛋白質が存在した場合、ジーントランスファーベクターが再びパッケージン

グされ、他の細胞に再感染する可能性がある。また3' LTRのプロモーターにより、ウイルスゲノムの3' 側に位置する宿主由来の遺伝子が発現されてしまう可能性がある (Rosenberg, N., Jolicoeur, P., *Retroviral Pathogenesis. Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 475-585, 1997)。この現象はレトロウイルスベクターにおいてすでに問題とされ、回避の方法としてSINベクターが開発された (Yu, S. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 83(10), 3194-8, 1986)。ジーントランスファーベクター上の3' LTRのU3部分を欠失させることにより、標的細胞内では5' LTRや3' LTRのプロモーターが無くなるため、全長のRNAや宿主遺伝子の転写が起こらない。そして、内部プロモーターからの目的遺伝子の転写のみが行われることになり、安全性が高く、高発現のベクターとなることが期待される。このようなベクターは、本発明において好適である。SINベクターの構築は、公知の方法および実施例5に記載の方法などに従えばよい。

レトロウイルスの産生には、宿主細胞でパッケージングシグナルを有するジーントランスファーベクターDNAを転写させ、gag, pol蛋白質およびエンベロープ蛋白質の存在下でウイルス粒子を形成させる。ジーントランスファーベクターDNAは、プラスミドのようなDNAベクターであってもよく、あるいはパッケージング細胞の染色体DNAに組み込まれていてもよい。ジーントランスファーベクターDNAにコードされるパッケージングシグナル配列は、この配列により形成される構造を保持できるように可能な限り長く組み込むことが好ましい一方で、該ベクターDNA上のパッケージングシグナルと、gag, pol蛋白質を供給するパッケージングベクターとの間で起こる組み換えによる野生型ウイルスの出現頻度を抑制するためにはこれらベクター間の配列の重複を最小限にする必要がある。従って、ジーントランスファーベクターDNAの構築においては、パッケージング効率および安全性の両者を満足させるために、パッケージングに必要な配列を含むできる限り短い配列を用いることが好ましい。

パッケージングシグナルとしては、パッケージングベクターが導入された細胞

によりパッケージングされる限り制限はなく、パッケージングベクターの種類に合わせて、レトロウイルス由来、レンチウイルス由来、免疫不全ウイルス由来のシグナルなどが用いられる。

例えば、実施例で用いたSIVagm由来のパッケージングベクターの場合は、HIVベクターはパッケージングされないため、用いられるシグナルの由来としてはSIVのみに制限されると考えられる。但し、HIV由来のパッケージングベクターを用いた場合、SIV由来のジーントランスファーベクターもパッケージングされるので、組換えウイルスの出現頻度を低下させるために、異なるレンチウイルス由来のジーントランスファーベクターとパッケージングベクターとを組み合わせるベクター粒子を形成させることが可能であると考えられる。この場合、霊長類のレンチウイルスの間の組み合わせ（例えば、HIVとSIV）であることが好ましい。

ジーントランスファーベクターDNAでは、gagタンパク質が発現しないように改変されていることが好ましい。ウイルスgagタンパク質は、生体にとって異物として認識され、抗原性が現れる可能性がある。また、細胞の機能に影響を及ぼす可能性もある。gagタンパク質を発現しないようにするためには、gagの開始コドンの下流に塩基の付加や欠失等によりフレームシフトするように改変することができる。また、gagタンパク質のコード領域の一部を欠失させることが好ましい。一般にウイルスのパッケージングには、gagタンパク質のコード領域の5'側が必要であるとされている。従って、ジーントランスファーベクターにおいては、gagタンパク質コード領域のC末側を欠失していることが好ましい。パッケージング効率に大きな影響を与えない範囲でできるだけ広いgagコード領域を欠失させることが好ましい。また、gagタンパク質の開始コドン（ATG）をATG以外のコドンに置換することも好ましい。置換するコドンは、パッケージング効率に対する影響が少ないものを適宜選択する。これにより構築されたパッケージングシグナルを有するジーントランスファーベクターDNAを、適当なパッケージング細胞に導入することにより、ジーントランスファーベクターDNAの転写産物を取りこまれたウイルスベ

クターを生産させることができる。生産させたウイルスベクターは、パッケージング細胞の培養上清等から回収することができる。

パッケージング細胞に使われる細胞としては、一般的にウイルスの産生に使用される細胞株であれば制限はない。ヒトの遺伝子治療用に用いることを考えると、細胞の由来としてはヒトまたはサルが適当であると考えられる。パッケージング細胞として使用されうるヒト細胞株としては、例えば293細胞、293T細胞、293 EBNA細胞、SW480細胞、u87MG細胞、HOS細胞、C8166細胞、MT-4細胞、Molt-4細胞、HeLa細胞、HT1080細胞、TE671細胞などが挙げられる。サル由来細胞株としては、例えば、COS1細胞、COS7細胞、CV-1細胞、BMT10細胞などが挙げられる。また、既存のパッケージング細胞を用いることも可能である。パッケージング細胞としては、例えばBosc23細胞、PE501細胞などが挙げられる。

ベクターが保持する外来遺伝子としては特に制限はなく、蛋白質をコードする核酸に加え、例えば、アンチセンスまたはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。

近年、遺伝子治療の標的として造血幹細胞をはじめとする各種の幹細胞が注目されている（花園豊，Molecular Medicine, Vol.36, No.7, 1999）。実施例に示したように、本発明のシュードタイプレトロウイルスベクターは、ヒト骨髓由来CD34陽性細胞に対し高い効率で遺伝子を導入することができるが、このCD34陽性細胞は造血幹細胞を含む分画として近年注目されている。CD34陽性細胞は、メチルセルロースを含む培地を用いたコロニーアッセイにおいて多分化能を持つこと（Kirshenbaum, A. S. et al., J. Immunol., 148(3), 772-7, 1992）や、複合免疫不全系統であるNOD / SCIDマウスにCD34陽性細胞を移植するとマウス骨髓に生着し造血系の再建が認められること（Larochelle, A. et al., Nat. Med., 2(12), 1329-37, 1996）が報告されており、少なくともCD34陽性細胞分画中に非常に未熟で幹細胞に近い状態の細胞が存在すると考えられている。また、CD34陽性細胞中の造血幹細胞は非分裂状態であり、一般にレトロウイルスベクターでは遺伝子

導入効率が低い (Kiem, H. P. et al., Curr. Opin. Oncol., 7(2), 107-14, 1995.)、本発明のシュードタイプ化ベクターにより感染効率を大幅に改善することが可能であると考えられる。特に、HIVやSIVベクターなどのレンチウイルスベクターを用いれば、非分裂細胞に対する遺伝子導入効率はさらに上昇することが期待される。本発明は、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクターを血球系または造血系細胞に接触させる工程を含む、血球系または造血系細胞へ遺伝子を導入する方法、および血球系または造血系細胞への遺伝子導入のための、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクターの使用に関する。ヘマグルチニン活性を有する蛋白質によりシュードタイプ化された本発明のレトロウイルスベクターは、血球系細胞および造血系細胞に対する高率な遺伝子導入が可能であるので、ADA欠損症 (Blaese, R. M., Pediatr. Res., 33(1 Suppl), S49-53, 1993)、血友病 (Kay, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 96(18), 9973-5, 1999)、および Fanconi 貧血症などの血液細胞を対象とした遺伝子治療において有用である。投与は例えばエクスピボ法により行うことができる。

血球系および造血系細胞に対する外来遺伝子導入の評価は、例えば既知の様々な表面抗原に対する抗体を用いたフローサイトメーターによる解析やコロニーアッセイ、造血系を破壊したマウスなどに造血細胞を移植して行う造血系再構築などにより検証することが可能である。

本発明のベクターが適用可能な造血細胞系を対象とした遺伝子治療としては、例えば、腫瘍を化学抗癌剤治療するときの幹細胞の保護を目的とした薬剤耐性遺伝子MDR1の利用 (Licht, T. et al., Gene Ther. (2000) 7, 4, 348-58)、ファンコーニ貧血症のための正常FANCC遺伝子の導入 (Liu, J. M. et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10, 14, 2337-46)、エクスピボ幹細胞増殖を補助するためのサイトカインの組み合わせ (トロンボポエチン、インターロイキン6および11、並びに Flt-3 リガンド) の導入 (W09907831)、血球減少症を治療するための Flt-3 アゴニ

ストなどのキメラ蛋白質の発現 (W09846750)、 β セラムアを治療するためのヒト β グロビン遺伝子の導入 (W09741141)、IL-6依存的な多発性骨髄腫治療のためのIL-6アンタゴニストと自殺遺伝子の発現の組み合わせ治療 (独国特許 DE19704979)、造血因子の組み合わせによる受容体アゴニスト [インターロイキン (GM-CSF, G-CSF-Ser17, M-CSF, エリスロポエチン, IL-1, IL-14, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15)、白血病抑制因子 (LIF)、flt3/flk2リガンド、ヒトソマトトロピン、B細胞増殖因子、B細胞分化因子、赤血球分化因子 (EDF)、または幹細胞因子 (SCF)] (W09712985)、幹細胞培養および造血疾患の遺伝子治療に用いられるc-mpl受容体アゴニスト (W09712978)、ヒト造血始原細胞の増殖に用いられるIL-6およびIL-6可溶型受容体の融合蛋白質 (Nat. Biotechnol. (1997) 15, 2, 142-45)、造血始原細胞の増殖に用いられるIL-6スーパーアゴニストおよびスーパーアンタゴニスト (W09618648)、血液疾患の治療に用いられるFactor-X (J. Cell. Bioche. (1995) Suppl. 21A, 410)、ヒト造血始原細胞の増殖に用いられる幹細胞因子、IL-6、および可溶型IL-6受容体複合体 (Gene Ther. (1995) 2, 9, 694)、RNAウイルスを標的とするリボザイムおよびHIV感染防御および細胞内免疫に有用なアンチセンスおよび/またはRNAデコイ (W09622368) などの遺伝子導入が挙げられる。

また本発明のHN蛋白シュードタイプレトロウイルスベクターは、鼻腔の粘膜上皮細胞および肺の気管支粘膜上皮細胞など、粘液を持つ細胞に対する感染能力が高い。本発明のベクターは、従来では遺伝子導入が困難であった粘液を持つ細胞への高率な外来遺伝子の導入に有用である。本発明は、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクターを粘液を有する細胞に接触させる工程を含む、粘液を有する細胞へ遺伝子を導入する方法、および粘液を有する細胞への遺伝子導入のための、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクターの使用に関する。粘液を有する細胞としては、特に粘膜上皮細胞、具体的には、例えば鼻腔または肺の気管支の粘

膜上皮細胞などが挙げられる。

具体的な適用例としては、例えば、抗原提示細胞（APC）の濃度が高いことを利点として応用した皮膚・粘膜への遺伝子（IL-2, IFN- γ , TGF- β 等）導入による免疫誘導（W09505853）、遺伝子の経口的粘膜投与によるロタウイルスワクチン（J. Virol. (1998) 72, 7, 5757-61）、自己免疫疾患を治療するための粘膜投与（W09746253）、感染予防のための粘膜投与（W09621356）、性病またはパピローマウイルス感染による子宮頸癌を予防するための、女性性器粘膜への遺伝子投与（Infect. Immun. (1998) 66, 1, 322-29）、粘膜投与による投与の容易性と安全性の向上（Proc. Am. Assoc. Cancer Res. (1995) 36, 86 Meet., 418）などが挙げられる。

本発明のシュードタイプレトロウイルスベクターは、薬学的に許容される担体または媒体と適宜組み合わせて組成物とすることができる。具体的には、例えば滅菌水、生理食塩水、培養液、血清、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などと適宜組み合わせて製剤化することが考えられる。さらに、その他にも、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。本発明の組成物は、水溶液、カプセル、懸濁液、シロップなどの形態であり得る。本発明のシュードタイプレトロウイルスベクターを含む組成物は試薬または医薬として有用である。例えば、各種細胞に対するインビトロまたはインビボでの遺伝子導入試薬として、または、エクスビボまたはインビボでの遺伝子治療のための医薬として、本発明の組成物を用いることができる。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、腹腔内注射、皮下注射、経腸投与、経口投与、鼻腔内投与、エクスビボ投与など当業者に公知の方法により行いうる。特に鼻腔または気管支粘膜への投与、および血球系・造血系細胞へのエクスビボ投与は好適である。

本発明のウイルスベクターは、その他の各種遺伝性疾患の遺伝子治療にも応用が可能である。対象となる疾患は特に制限されない。例えば、対象となり得る疾患とその単一原因遺伝子としては、ゴーシェ病においては β -セレブロシダーゼ

(第20染色体)、血友病においては血液凝固第8因子(X染色体)および血液凝固第9因子(X染色体)、アデノシンデアミナーゼ欠損症においてはアデノシンデアミナーゼ、フェニルケトン尿症においてはフェニルアラニンヒドロキシラーゼ(第12染色体)、Duchenne型筋ジストロフィーにおいてはジストロフィン(X染色体)、家族性高コレステロール血症においてはLDLレセプター(第19染色体)、嚢嚢性繊維症においてはCFTR遺伝子の染色体への組み込み等が挙げられる。それら以外の複数の遺伝子が関与していると思われる対象疾患としては、アルツハイマー、パーキンソン病等の神経変性疾患、虚血性脳障害、痴呆、またエイズ等の難治性の感染症等が考えられる。エイズ患者の造血幹細胞を細胞外にとりだし *in vitro* でSIVベースの本発明のベクターを作用させて、HIVの感染が起こる前にSIVに由来するゲノム転写を優勢にして、患者の体に戻し、HIVの転写因子を無効にする治療方法が考えられる。さらには、慢性疾患への応用として、虚血性心疾患においてはVEGFならびにFGF2遺伝子、動脈硬化の遺伝子治療に関しては、細胞増殖関連遺伝子、例えば細胞増殖因子(PDGF、TGF- β 等)、Cyclin-dependent kinase等の発現抑制への応用が可能となる。また糖尿病においてはBDNF遺伝子が候補となりうる。またこの方法により、遺伝子変異が癌化を引き起こす癌抑制遺伝子p53等の遺伝子を染色体に組み込む補充治療への応用、多剤耐性遺伝子を *in vitro* で骨髓由来造血幹細胞に導入した後、患者の血液に戻すことによって、癌の薬物治療の限界を超えた治療が可能となる。自己免疫疾患、例えば多発性硬化症、慢性関節リウマチ、SLE、糸球体腎炎等の遺伝子治療に関しては、T細胞レセプター、各種接着因子(例えばICAM-1、LFA-1、VCAM-1、LFA-4等)、サイトカインおよびサイトカインレセプター(例えばTNF、IL-8、IL-6、IL-1等)細胞増殖因子(例えばPDGF、TGF- β 等)、作用因子(例えばMMP等)のアンチセンス発現による発現抑制への応用が可能となる。アレルギー性疾患の遺伝子治療に関しては、IL-4、Fc ϵ R-I等のアンチセンス発現による発現抑制への応用が可能となる。臓器移植に関連する遺伝子治療に関しては、ヒト以外の動物ドナーの組織適合性抗原をヒト型

に変えて異種移植の成功率を高める応用が可能となる。さらにはヒトES細胞の染色体に外来遺伝子を導入し、胚の段階で欠損する遺伝子を補って、体循環する酵素、成長因子等の不足を補充する治療が考えられる。

例えば、IL-4はヘルパーTリンパ球のTh2リンパ球への分化を促す。Th2リンパ球はIL-4、IL-5、IL-9、IL-13といった喘息の炎症を媒介するサイトカインを分泌する。IL-4は呼吸障害に関与する肺粘液膜からの粘液分泌を誘導する分子の1つである。IL-4は、好酸球表面に存在するVLA 4分子と相互作用する細胞接着分子であるVCAM-1の発現を制御している。この相互作用により、好酸球は血液中から肺組織の炎症部位へ移動することができる。IL-4はB細胞の増強と、アレルギー反応を引き起こすために必要な抗原特異的IgEの産生を誘導する。抗原特異的IgEはマスト細胞がヒスタミン、ロイコトリエンといった炎症の媒介となる物質の放出を引き起こし、これらが、気管支収縮を引き起こす、このようなIL-4の役割から、喘息患者を対象とした可溶性インターロイキン4 (IL-4) 受容体などを発現するベクターも有用である。

図面の簡単な説明

図1は、センダイウイルスF、HN、またはF、HN蛋白質でシュードタイプ化したマウス幹細胞ウイルス (MSCV) を、293T細胞に感染させた結果を示す写真である。EGFPを発現するジーントランスファーベクター (pMSCV EGFP) を用いてウイルスのパッケージングを行った。パネル上部の「F」、「HN」、並びに「F/HN」は、それぞれ、パッケージング細胞でセンダイウイルスのF、HN、並びに FおよびHNを発現させて産生させたウイルスを感染させた結果を示す。「VSV-G/Null」の欄は、上段はVSV-Gによりシュードタイプ化したポジティブコントロール、中段および下段はF、HN、およびVSV-Gなどのシュードタイプ化のためのenv蛋白を発現させなかった非シュードタイプ化のネガティブコントロールを示す。パネル右の「Eco」および「Ampho」は、パッケージング細胞に、それぞれエコトロピックenvおよびアンフ

オトロピックenvを発現させて産生したウイルスを用いた結果を示す。「Null」はレトロウイルスenvを発現させなかったことを示す。

図2は、センダイウイルスHNでシュードタイプ化したアンフォトロピックenvを持つレトロウイルスのHAアッセイの結果を示す写真である。ウイルスの産生のために用いた pMSCV EGFP、pCl-Ampho、および pCAGGS-HN の量を併記した（図中の MSCV : AMPHO : HN）。対照のアンフォトロピックenvを持つレトロウイルス（図中の Ampho-Retro）では赤血球凝集は起こらなかったが、センダイウイルスHNでシュードタイプ化したレトロウイルス（図中の HN-Ampho-Retro）では凝集反応を起すことが確認された。

図3は、センダイウイルスHN蛋白質でシュードタイプ化したアンフォトロピックenvを持つMSCV（図中 HN-ampho）をヒト骨髓細胞に感染させ、フローサイトメーターでCD34をマーカーに分画してそれぞれの感染細胞（GFP発現細胞）の比率を測定した結果を示す図である。図中の ampho はHN蛋白質でシュードタイプ化していない対照である。それぞれのカラムは、CD34陰性（CD34⁻）細胞およびCD34陽性（CD34⁺）細胞に対するGFP陽性細胞率を表す。

図4は、構築のベースとなった SIVagm ゲノムプラスミド（a）および構築したパッケージングベクター（b）、ジーントランスファーベクター（c）、VSV-G供給ベクター（d）の構造模式図である。

図5は、SIVagmベクターによる293 T細胞に対するβガラクトシダーゼ遺伝子導入の結果を示す写真である。上段はベクタープラスミドをトランスフェクションした細胞からとった上清を用いて、293T細胞に対してベクター感染を行い48時間後に X-gal 染色を行った結果を示す。多くの細胞でβガラクトシダーゼの発現がみられる。下段は無処理対照細胞の X-gal 染色である。

図6は、SIVagm SIN ベクターにより、G2-M期で停止状態の293T 細胞およびレチノイン酸により分化を誘導した SH-SY5Y 細胞に対してEGFP遺伝子を導入、蛍光顕微鏡で発現を確認した結果を示す写真である。上段：293T ×100、下段：SH-S

Y5Y ×200

図7は、粒子径を揃えたFHNビロソームおよびFビロソームのウェスタンブロットの結果を示す写真である。

図8は、不活化センダイウイルス (SeV)、FHNビロソーム、またはFビロソームと融合させたSIV (それぞれ図中の SIV-SeV融合、SIV-FHNビロソーム融合、または SIV-Fビロソーム融合) をHeLa細胞の培養上清にMOI=10で添加し、10分、30分、および180分インキュベートして感染させ、その後新鮮な培養液に置換し感染処理開始の48時間後に感染細胞 (GFP発現細胞) を観察した結果を示す写真である。SIVはVSV-Gでシュードタイプ化されているものを用いた。図中のSIVはセンダイウイルスエンベロープを融合させていないネガティブコントロールである。

図9は、FHNビロソーム、Fビロソーム、およびHNビロソームのサンプルを電気泳動し、銀染色を行った結果を示す写真である。レーン1: SeV (インタクト)、レーン2: DTT処理SeV、レーン3: トリプシン処理SeV、レーン4: FHNビロソーム、レーン5: Fビロソーム、レーン6: HNビロソーム。

図10は、LacZを発現するSIVベクター (VSV-Gでシュードタイプ化したもの) および、それをさらにビロソームとFusionさせたベクターを293T細胞へ導入し、LacZ相対活性を測定した結果を示す図である。アスタリスクはt検定により SIV に対して有意差があることを示す ($p<0.05$)。

図11は、SIV-F/HN/M-EGFP 10^8 T.U. を鼻より $100\mu\text{l}$ 投与し、3日目の気管の凍結標本の所見を示す写真である。(b)の矢印は気管上皮細胞を示し、EGFPの蛍光が認められるが、(c)の無処理マウスでは僅かなバックグラウンドが観察されるに過ぎない。(a)は連続切片のヘマトキシリン・エオシン (H.E.) 染色を示す。

図12は、図11と同じ個体の鼻中隔粘膜の所見を示す写真である(b)。矢印は多列線毛上皮であり、EGFPの蛍光が認められる。(a)は連続切片の H.E. 染色を示す写真である。

図13は、マウス鼻腔切片におけるシュードタイプレトロウイルスベクターのE

GFPの蛍光の比較を示す写真である。VSV-Gでシュードタイプ化したSIV (SIV-VSV-EGFP)、F, HN, Mでシュードタイプ化したアンフォトロピックenvを持つMSCV (MSCV-F/HN/M-EGFP)、およびF, HN, Mでシュードタイプ化したVSV-G SIV (SIV-F/HN/M-EGFP) のEGFPの蛍光像を示す。F, HN, M蛋白を持つMSCV-F/HN/M-EGFおよびSIV-F/HN/M-EGFPにおいて比較的強いシグナルが観察され、特にSIV-F/HN/M-EGFPによるシグナルが高いことが判明した。

図14は、細胞質側領域置換型HN発現プラスミドがコードする蛋白質のSIV細胞質側領域とHN蛋白膜貫通領域（標準字体）の境界部分のアミノ酸配列（配列番号：40）を示す図である。

図15は、SIV細胞質側領域付加型HN発現プラスミドがコードする蛋白質の細胞質側領域（下線部）とHN蛋白膜貫通領域（標準字体）の境界部分のアミノ酸配列（配列番号：41）を示す図である。

図16は、細胞質側領域欠失型F発現プラスミドがコードする蛋白質のF蛋白膜貫通領域（イタリック）とF蛋白細胞質側領域（標準字体）の境界部分のアミノ酸配列（配列番号：42～44）を示す図である。

図17は、SIV細胞質側領域を付加した細胞質側欠失型F発現プラスミドがコードする蛋白質のF蛋白膜貫通領域（下線なしのイタリック）およびF蛋白細胞質側領域（標準字体）とSIV細胞質側領域11アミノ酸（SIV_{c11}）（下線）の境界部分のアミノ酸配列（配列番号：45～47）を示す図である。

図18は、SeV F/HNシュードタイプSIVベクターの293T細胞における遺伝子導入を示す写真である。

図19は、SeV F/HNシュードタイプSIVベクターのBEAS-2B細胞における遺伝子導入を示す写真である。

図20は、SIV_{c11} 付加型のSeV F/HNシュードタイプSIVベクターの293T細胞における遺伝子導入を示す写真である。

図21は、SeV F/HNシュードタイプSIVベクターの濃縮を示す写真である。

図 2 2 は、MSCV をベースとした SeV F/HN シュードタイプレトロウイルスベクターの遺伝子導入を示す写真である。

図 2 3 は、インフルエンザウイルスエンベロープシュードタイプウイルスベクターの遺伝子導入を示す写真である。

図 2 4 は、インフルエンザウイルスエンベロープシュードタイプウイルスベクターの濃縮を示す写真である。

図 2 5 は、インフルエンザウイルスエンベロープおよび各種 HN 蛋白質とのシュードタイプウイルスベクターの遺伝子導入を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書に引用された文献は、全て本明細書の一部として組み込まれる。

〔実施例 1〕 センダイウイルスエンベロープ蛋白によるシュードタイプレトロウイルスベクターの調製

センダイウイルス Z 株の全長ゲノム DNA pSeV18⁺b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) から切り出した F、HN、および M 蛋白遺伝子を pCAGGS (Niwa, H. et al., Gene: 108, 193-9, 1991) の XhoI サイトに導入することにより、センダイウイルス由来 F、HN および M 蛋白発現ベクター（それぞれ pCAGGS F、pCAGGS HN、および pCAGGS M と称す）を作製した。

レトロウイルス産生に用いたヒト胎児腎細胞由来細胞株 293T 細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, pp. 8392-8396, 1993) は、10% 非動化ウシ胎児血清を含む D-MEM (GibcoBRL) で培養した。培養はすべてプラスチックプレート（住友ベークライト）で行った。ベクターのトランスフェクションは LIPOFECTAMINE PLUS (GibcoBRL) を用いて添付説明書に従って行った。293T 細胞を 6 ウェルのプラスチックプレート（住友ベークライト）へ 1 ウェルあたり 1×10^6 個の細胞密度で

まき、炭酸ガスインキュベーター中（37℃、10%炭酸ガス存在下）で48時間培養した。トランスフェクションの30分前に培養液を1ウェルあたり800 μ lの1%ウシ血清アルブミン（GibcoBRL）を含むD-MEM（GibcoBRL）に培地交換し培養を続けた。

ジーントランスファーベクターとしては、マウス幹細胞ウイルス（Murine Stem Cell Virus; MSCV）（CLONTECH社製）（R. G. Hawley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10297-10302 (1996); R. G. Hawley et al., Gene Therapy 1: 136-138 (1994)）をベースとするベクターでレポーター遺伝子としてEGFP遺伝子を組み込んだものを使用した。トランスフェクションに使用するDNA量は1ウェルあたり700ngのジーントランスファーベクターと、300ngのパッケージングベクター（pCL-Eco, pCL-Ampho (MuMLV 4070A)、共にIMGENEX社）（Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)）とを使用し、それらに加えて200ngのセンダイウイルスエンベロープ蛋白発現ベクター（pCAGGS Fと pCAGGS HN）や200ngのセンダイウイルスM蛋白発現ベクター（pCAGGS M）とを組み合わせ使用した（表2）。DNAを100 μ lのOptiMEMに溶解後に6 μ lのPLUS reagent（GibcoBRL）を加えて攪拌後15分室温で静置した。DNAとPLUS reagent（GibcoBRL）との混合液に、100 μ lのOptiMEMで希釈した4 μ lのLIPOFECTAMINEを添加して攪拌後さらに15分室温で静置した。以上の方法により調製したDNAとLIPOFECTAMINEとの複合体を含む溶液を6ウェルプレートで培養している293T細胞へ滴下してゆるやかに攪拌した後に炭酸ガスインキュベーター中（37℃、10%炭酸ガス存在下）で3時間培養した。培養後1ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミン（GibcoBRL）と15 μ g/mlの濃度のトリプシン（GibcoBRL）を含むD-MEM（GibcoBRL）を添加し、炭酸ガスインキュベーター中（37℃、10%炭酸ガス存在下）で24時間培養した後に培養上清を0.45 μ mのポアサイズのフィルター（DISMIC-25CS フィルター、ADVANTEC）で濾過してベクター溶液として使用した。

〔実施例2〕 センダイウイルスエンベロープ蛋白によるレトロウイルスベクタ

一のシュードタイプ化の効果

センダイウイルスエンベロープ蛋白によりシュードタイプ化したレトロウイルスベクターを上記のようにして製造し、その効果を検討した。

標的細胞である293T細胞を6ウェルのプラスチックプレート（住友ベークライト）へ1ウェルあたり 1×10^6 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中（37℃、10%炭酸ガス存在下）で48時間培養した。標的細胞にはウイルスベクターを含む溶液に非動化ウシ胎児血清を最終濃度10%、ポリブレン（Sigma）を最終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ になるように添加した溶液を重層する事でウイルスベクターの導入を行った。ベクター導入してから48時間後に標的細胞を2%ホルムアルデヒドと0.2%グルタルアルデヒドを含むPBS（Invitrogen社）で室温20分間固定し、PBS（Invitrogen社）で1回洗浄後に蛍光倒立型顕微鏡（DMIRB(SLR), ライカ）で検鏡して標的細胞でのEGFPの発現を検出した。

まずレトロウイルスベースのジーントランスファーベクター（pMSCV EGFP）をパッケージングベクターの非存在下で293T細胞に導入する際にセンダイウイルスのエンベロープ蛋白であるF蛋白発現プラスミド（pCAGGS F）、またはHN蛋白発現プラスミド（pCAGGS HN）のいずれか、或いは両者を同時に導入して培養上清を回収し、標的細胞である293T細胞へEGFP遺伝子の導入やEGFP蛋白の導入が認められるかを検討した。表2の下半分“(①)”以降の12種類の組み合わせで作製したベクターを293T細胞へ感染させた結果を図1に示す。図1のNullのパネルに示すようにF蛋白、HN蛋白を発現させてもパッケージングベクターの非存在下ではヒト細胞への遺伝子や蛋白の導入は認められなかった。従ってF蛋白やHN蛋白のみの発現では遺伝子導入能を有するレトロウイルスベクターの産生や、EGFP蛋白の標的細胞への導入は起こらないと考えられた。

ヒトの細胞に感染性のないエンベロープ蛋白質であるエクトロピックエンベロープ蛋白によりパッケージングを行った場合、図1のEcoのパネルに示すようにF蛋白或いはHN蛋白単独でシュードタイプ化した場合はヒト細胞への遺伝子導入は

認められなかったが、F蛋白とHN蛋白を同時に発現させてシュードタイプ化した場合には本来感染性のないヒト細胞への遺伝子導入が認められた。この結果からセンダイウイルス以外のウイルス由来のベクターをセンダイウイルスのF蛋白とHN蛋白でシュードタイプ化しうる、それによりセンダイウイルス以外のベクターの感染宿主域を拡大しうる事が明らかとなった。

ヒトの細胞に感染性をもつエンベロープ蛋白質であるアンフォトロピックエンベロープ蛋白によってパッケージングを行った場合、図1のAmphoのパネルに示すようにHN蛋白単独、或いはF蛋白とHN蛋白を同時に発現させてシュードタイプ化させた場合に遺伝子導入効率が向上することが明らかとなった。この結果からセンダイウイルス以外のウイルス由来のベクターをセンダイウイルスHN蛋白単独でもシュードタイプ化しうる、センダイウイルスHN蛋白単独によるシュードタイプ化或いはセンダイウイルスF蛋白とHN蛋白でシュードタイプ化することによりセンダイウイルス以外のウイルス由来のベクターの遺伝子導入効率を向上しうる事が明らかとなった。

またセンダイウイルスは本来肺の気管支粘膜上皮細胞など粘液を持つ細胞に対する感染能力が高い事から、HN蛋白単独、或いはF蛋白とHN蛋白を用いて他のベクターをシュードタイプ化することは粘液を持つ細胞への遺伝子導入に有用であると考えられる。

【実施例3】 HN-Amphoシュードタイプレトロウイルスベクターの生産および造血幹細胞を含むヒト骨髓細胞に対する遺伝子導入効率のアンフォトロピックレトロウイルスベクターとの比較

1. 293T細胞の培養

293T細胞は10%FCS、800 μ g/ml G418添加ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)にて通常の方法を用いて培養した。トランスフェクション前日に 8×10^6 細胞/10cmプレートになるように希釈し、10%FCS添加DMEMにて培養した。

2. トランスフェクション

pMSCV EGFP、pCl-Ampho (IMGENEX社)、pCAGGS-HNを、それぞれ5.6、2.4、1.6 μ gを混ぜ合わせOPTIMEMを800 μ l加え、さらにLipofectamine plus (GIBCOBRL) キットのplus液を48 μ l加え混ぜ合わせた後15分放置した。別のチューブにOPTIMEM 800 μ lとLipofectamine液 32 μ lを混ぜ合わせておいた。DNA混合液とLipofectamine混合液を混ぜ合わせ、15分放置した。培地を除いて、1%BSA添加DMEMを500 μ l加えた293T細胞にトランスフェクション混合液をまんべんなく滴下し、37°C、5%炭酸ガス環境下で培養した。コントロールとしては、pMSCV EGFP、pCl-Amphoを5.6 μ g、4.0 μ gを用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション3時間後に培地を10%FCS添加イスコフ変法DMEM (IMDM) 10mlに置き換えた。翌日再び10%FCS入りIMDMに培地を交換し、さらに24時間培養を続けた。

3. ウィルス液の回収

トランスフェクション48時間後に細胞培養上清を回収し、0.45 μ mのフィルターにて濾過し、-80°Cにて保存した。

4. ヘマグルチニン活性の測定

pMSCV EGFP、pCl-Ampho、pCAGGS-HNの量比を幾つかに変えて、上記と同様にHNによりシールドタイプ化されたアンフォトロピックenvを持つレトロウィルスを調製した。このウィルスのヘマグルチニン活性（赤血球凝集活性；HA活性）を調べた。対照として、アンフォトロピックenvを持つレトロウィルスのヘマグルチニン活性も調べた。HA活性の測定は常法に従って行った。その結果、HNおよびアンフォトロピックenvによりシールドタイプ化されたレトロウィルスにおいてHA価が確認され、ウィルス粒子にヘマグルチニン活性を有する蛋白質が含まれていることが確認された（図2）。

5. ヒト骨髓CD34⁺細胞への遺伝子導入

ヒト骨髓CD34⁺細胞はBIO WHITTAKER社より購入した。解凍後、50ng/ml IL-6、100ng/ml TPO、100ng/ml Stem Cell Factor (GIBCO BRL)、100ng/ml Flt-3リガンド (Research Diagnostics, Flanders, NJ)（いずれもヒトレコンビナント）、10

%FCS添加IMDMにて、3で回収した組換えウイルス 1×10^5 /mlにて 37°C 、5% CO_2 下で一晩培養した。培養開始48、51、72、75時間後培地を新しく解凍したウイルス液に交換し50ng/ml IL-6、100ng/ml TPO、100ng/ml Stem Cell Factor、100ng/ml Flt-3リガンドを添加した。培養開始120時間後、細胞を回収した。

6. フローサイトメーターによる解析

回収した細胞はPE標識抗ヒトCD34抗体 (Becton Dickinson) を用いて染色した後、フローサイトメーター (EPICS ELITE、Coulter) にてGFP、PEの2蛍光にて解析を行った。その結果、野生型エンベロープを持つアンフォトロピックレトロウイルスベクター (ampho) のCD34陰性細胞 (CD34-) およびCD34陽性細胞 (CD34+) におけるGFP陽性細胞の比率はそれぞれ 0.3%および 3.6%に過ぎなかったのに対し、シュードタイプエンベロープを持つ HN-アンフォトロピックレトロウイルスベクター (HN-ampho) のCD34陰性細胞およびCD34陽性細胞におけるGFP陽性細胞の比率はそれぞれ 33%および 25%に達し、HNタンパク質によるシュード化により、造血幹細胞を含むヒト骨髄細胞に対する遺伝子導入の効率が有意に上昇することが判明した (図3)。

〔実施例4〕 シュードタイプウイルスベクターの作製方法

ジーントランスファーベクターとして、上記のpMSCV EGFPまたはモロニーマウス肉腫ウイルス (Moloney murine sarcoma virus) 由来のLTRの制御下にlacZを発現するpLZRNL (Yee, J.-K. et al., Methods In Cell Biology, vol. 43, pp.99-112 (1994); Xu, L. et al., Virology 171, 331-341 (1989)) を用いて、様々なエンベロープ蛋白質でシュードタイプ化したレトロウイルスベクターを作製した。

293T細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞株) は、10%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 高グルコース (Gibco BRL) を用いて、 37°C 、10% CO_2 で培養した。この293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり 5×10^5 個でまき、 37°C 、10% CO_2 で48時間

カルチャーした。培養液を1ウェルあたり800 μ lの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。1ウェルあたりジーントランスファーベクター (pMSCV EGFPまたはpLZRNL) 700ng、VSV-G発現プラスミドpVSV-G (Indiana血清型株由来) (Clontech) 100ng、Sendai virus HN、F、およびM蛋白発現プラスミドpCAGGS-HN、pCAGGS-F およびpCAGGS-Mをそれぞれ200ng、並びにマウスレトロウイルス外殻蛋白発現プラスミドpCL-Eco、およびpCL-Ampho (Imgenex) (Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)) 300ngを、以下の表2のような組み合わせで100 μ lのOpti MEMに溶解後6 μ lのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、100 μ lのOpti MEMで希釈した4 μ lのLIPOFECTAMINE Reagent (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37 $^{\circ}$ C、10% CO₂下で3時間カルチャーした。1ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミンおよび15 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、37 $^{\circ}$ C、10% CO₂で、48時間培養後に培養上清を回収、0.45 μ mのフィルターで濾過したものをベクター浮遊液とした。

表 2

	env		ジーントランスファーベクター	
	Retro	SeV/VSV	in vitro	in vivo
①	-	F/M	pMSCV-EGFP または pLZRNL	pMSCV-EGFP (⑨ : 図 13)
②		HN/M		
③		F/HN/M		
④	Eco	F/M		
⑤		HN/M		
⑥		F/HN/M		
⑦	Ampho	F/M		
⑧		HN/M		
⑨		F/HN/M		
⑩	Eco	-		
⑪	Ampho	-		
⑫	Eco	VSV-G		
(①)	-	F	pMSCV-EGFP または pLZRNL (図 1)	ND
(②)		HN		
(③)		F/HN		
(④)	Eco	F		
(⑤)		HN		
(⑥)		F/HN		
(⑦)	Ampho	F		
(⑧)		HN		
(⑨)		F/HN		
(⑩)	Eco	-		
(⑪)	Ampho	-		
(⑫)	Eco	VSV-G		

(表中、「Env」の欄は、ウイルスの製造に用いたレトロウイルス (Retro)、センダイウイルス (SeV)、または水疱生口内炎ウイルス (VSV) 由来のエンベロープ蛋白質等を示す。ジーントランスファーベクターとしてはpMSCV EGFPまたはpLZRNLを用い、表に示したようにインビトロおよびインビボにおける遺伝子導入に使用した。ジーントランスファーベクターにpMSCV EGFPを用いて作製した上段の“⑨”のベクターは図13の実験で使用したベクターである。pLZRNLを用いて作製した下段の“(①)”以降の12種類のベクターは図1の実験で使用したベクターである。)

[実施例5] VSV-Gシュードタイプレンチウイルスベクターの構築

ベクター系の構築には、非病原性のアフリカミドリザル免疫不全ウイルスのクローンであるSIVagm TY0-1株を用いた。ヌクレオチドの番号は以下すべてウイル

スRNAの転写開始点を +1 として表記した。SIVagm TYO-1を組み込んだプラスミドとしてはpSA212 (J. Virol., vol. 64, pp. 307-312, 1990) を用いた。また、ライゲーション反応は、すべてLigation High (東洋紡) を用い添付説明書に従って行った。合成オリゴヌクレオチドは、すべて (株) グライナーージャパンDNA受託合成事業部に依頼し、日本製粉 (株) 生物化学研究部にて合成、逆相カートリッジ精製または逆相HPLC精製したものを使用した。合成オリゴヌクレオチドの配列は以下の通りである。

1F(VTRF-BglIII) : 5'-GCAGATCTCAACCAGGAGGCGAG&CTGCATTTTGGG-3' (配列番号 : 1)

1R(VTRR-EcoRI) : 5'-GCGAATTCTACTTACTGGTGCTGTAAAGGAGCCAAA-3' (配列番号 : 2)

2F(RRE6964E) : 5'-ATCGGAATTCTTTTATTGTAAGATGGATTGGTTTTTAAAT-3' (配列番号 : 3)

2R(RRE-SA+BN) : 5'-CGGGATCCGCGGCCGCGGATATGGATCTGTGGAGATAGAGGAACATAT-3' (配列番号 : 4)

3F(SDFX_{ho}Spe) : 5'-TCGAGACTAGTGACTTGGTGAGTAGGCTT-3' (配列番号 : 5)

3R(SDR-Sal) : 5'-TCGAAAGCCTACTCACCAAGTCACTACTC-3' (配列番号 : 6)

4F : 5'-AATTTCTCGAGCGGCCGCA-3' (配列番号 : 7)

4R : 5'-AATTTGCGGCCGCTCGAGA-3' (配列番号 : 8)

5-1F(5LTRU3FK_pn) : 5'-GCGGTACCTGGATGGGATTTATTACTCCGATAGGA-3' (配列番号 : 9)

5-1R(GAGR-2Eco) : 5'-GCGAATTCGATAGGGCTTGAAACATGGGTACTATTTCTGC-3' (配列番号 : 10)

5-2F(RREF-EcoRI) : 5'-GCGAATTCCTGTTGTGCTAGGGTTCTTAGGCTTCT-3' (配列番号 : 11)

5-2R(RRESA+Rsac) : 5'-TCCCCGCGGATATGGATCTGTGGAGATAGAGGAACATATC-3' (配列番号 : 12)

号 : 1 2)

5-3F(3LTRF BS) : 5'-GCGCGGCCGCGGATCCGTCGACGCACTTTTAAAAGAAAAGGGA-3' (配列

番号 : 1 3)

5-3R(3LTRR-SacI) : 5'-GCGAGCTCTAATGCAGGCAAGTTTATTAGCTTTCTA-3' (配列番号 :

1 4)

6F(CMVFEcoSac) : 5'-GGAATTCCTCCGCGGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG-3' (配列番号

: 1 5)

6R(EGFPRstoNB) : 5'-CGGGATCCGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3' (配列番号

: 1 6)

9-1F(LTRF1 CMVU3F) : 5'-TATATAAGCAGAGCTCGCTGGCTTGTAACCTCAGTCTCTTA-3' (配列

番号 : 1 7)

9-2F(LTRF2 EF1aU3F) : 5'-TATATAAGTGCAGTACGCTGGCTTGTAACCTCAGTCTCTTA-3' (配列

番号 : 1 8)

9-3F(CAGU3F) : 5'-TATAAAAAGCGAAGCCGCTGGCTTGTAACCTCAGTCTCTTA-3' (配列番号 :

1 9)

9R(GAGR-2Eco) : 5'-GCGAATTCGATAGGGCTTGAAACATGGGTACTATTTCTGC-3' (配列番号 :

2 0)

10-1F : 5'-CGGGGTACCTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATT-3' (配列番号 : 2 1)

10-1R(U3CMVR) : 5'-AGTTACAAGCCAGCGAGCTCTGCTTATATAGACCTCCAC-3' (配列番号 :

2 2)

11F(LTRF LdU3FSa1SC) : 5'-ATGCGAGCTCGTCGACGCACTTTTAAAAGAAAAGGGAGGACTGGAT

GGGATTTATTACTCCGATAGGACGCTGGCTTGTAACCTCAGTCTCTTACTAGG-3' (配列番号 : 2 3)

11R(3LTRR-SacI) : 5'-GCGAGCTCTAATGCAGGCAAGTTTATTAGCTTTCTA-3' (配列番号 : 2

4)

<PCRによるDNA断片の調整>

PCRはすべてPCR Supermix High Fidelity (Gibco BRL) を用いて行った。反応

液90 μ lに1 μ gのテンプレートDNA、プライマーとして2種の合成オリゴヌクレオチドを最終濃度 1 nmol/ml になるように添加し、蒸留水で全量を100 μ lとした後、GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) を用いて反応を行った。94°C 1分間の反応後に94°C30秒→55°C30秒→68°C90秒の反応を10サイクル行い、最後に68°Cで5分間の反応を行った。反応後のサンプルをWizard DNA Clean-up System (Promega) で精製し、末端をそれぞれの制限酵素で切断し、1%低融点アガロースゲル (SeaPlaque GTG agarose, FMC Biochem, TAEバッファーに溶解) で分離後に目的のサイズのDNA断片をゲルより切り出し Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) で精製し、ライゲーションに用いた。

<ベクターの構築>

ベクターの基本構造となるプラスミドを構築した (図4)。ベクター粒子形成に必要な蛋白質をトランスに供給する「パッケージングベクター」、ベクターにパッケージングされるmRNAを供給し、標的細胞に対して目的の遺伝子を運搬、導入する「ジーントランスファーベクター」、シュードタイプベクター粒子を形成するための外殻蛋白質供給ベクターのVSV-Gである。

ベクター粒子形成に必要な蛋白質を供給するため、gag、pol、tat、rev、vif、vpr / xの各配列をプロモーター下流に配置した発現プラスミドを構築した。野生型ウイルスの産生を回避するためパッケージングシグナル Ψ およびenvの大部分を除去した。gag上流にSD配列、tat / revの第一エクソンの下流にRRE配列を挿入し、パッケージングベクター上のすべての遺伝子が発現しうるようにした。さらに、ベクターのパッケージングに必須ではないと考えられたためnefの全配列を除外した (図4b)。

ベクター内にパッケージングされるRNAを供給するジーントランスファーベクターには、ゲノム両端のLTR配列、SD、 Ψ 、RREを組み込んだ。さらに、ジーントランスファーベクターの5' LTRプロモーター領域を外来のプロモーターと置換した。また、3' LTRの配列を部分的に削除し、標的細胞から全長のベクターmRNAが

転写されることを防止するSelf Inactivating Vector (SINベクター) を作製し、レポーター遺伝子のプロモーターとしてCMVプロモーター、レポーター遺伝子として β ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだ (図4c)。

VSV-G供給ベクターとして、これまでにレトロウイルスベクター、HIVベクターのシュードタイプ化において実績のあるpVSV-Gを使用した (図4d) (Burns, J. C. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8033-8037)。

以下にその詳細を記載する。

<パッケージングベクターの構築>

vifとtat / revの第1エクソンを含む領域 (5337-5770) に相当するDNA断片をプライマー1Fおよび1Rを用いてpSA212をテンプレートとしたPCRにより得た。PCRプライマーに制限酵素部位であるEcoRI部位を付加することでDNA断片の3' 端にEcoRI部位を持つ断片を調節した。PCR断片をBglIIとEcoRIにより切断した後、アガロースゲル電気泳動とWizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) で精製した。以上のようにして得たDNA断片と、gag / pol領域をコードするDNA断片 (XhoI (356) 部位からBglII (5338) 部位まで) を、pBluescript KS+ (Stratagene) のXhoI-EcoRI部位へライゲーションした。次に、Rev responsive element (RRE) とtat / revの第2エクソンを含む領域 (6964-7993) に相当するDNA断片をPCRで増幅した。上記のPCR断片と同様にプライマー2Fと2Rを用いてpSA212をテンプレートとしたPCRにより3' 端にNotI部位を付加し、EcoRIとNotIで切断後に精製し、gag-tat / revを組み込んだpBluescript KS+のEcoRI-NotI部位へ組み込んだ。

スプライシングドナー (SD) 部位は、この配列を含むDNA断片を合成 (3Fと3R) し、合成時に5' 端にXhoI部位、3' 端にSalI部位を付加し、上記のgag-RRE-tat / revを組み込んだpBluescript KS+のXhoI部位に組み込んだ。得られたプラスミドをXhoIとNotIにより切断し、SD- gag-RRE-tat / revを含む断片を精製した。pCAGGS (Gene, vol.108, pp.193-200, 1991) のEcoRI部位にXhoI / NotIリンカー

(4Fと4R)を組み込んだプラスミドを作製し、XhoI-NotI部位に上記のSD- gag-RRE-tat / rev断片を組み込んだ。以上の方法により得られたプラスミドをパッケージングベクターpCAGGS / SIVagm gag-tat / revとして使用した。

<ジーントランスファーベクターの構築>

SIVagmTY01由来の5' LTR領域 (8547-9053 + 1-982、5' 端にKpnI部位、3' 端にEcoRI部位を付加) をプライマー5-1Fと5-1Rで、3' LTRを含む領域 (8521-9170、5' 端にNotI部位とBamHI部位、3' 端にSacI部位を付加) をプライマー5-3Fと5-3Rで、RRE配列 (7380-7993、5' 端にEcoRI部位、3' 端にSacII部位を付加) をプライマー5-2Fと5-2Rで、pSA212をテンプレートとしたPCRでそれぞれ増幅した。pEGFPN2 (Clontech) 由来のCMVプロモーター領域 (1-600、5' 端にSacII部位、3' 端にNotI部位を付加) をプライマー6Fと6Rで増幅した。これらのDNA断片の末端を切断、精製後にpBluescript KS+ のKpnI-SacI部位に5' LTR→RRE→CMVプロモーター→3' LTRの順でライゲーションし組み込んだ。レポーター遺伝子としてpCMV β (Clontech) 由来の β ガラクトシダーゼ遺伝子を含むNotI断片をNotI部位へ組み込み、KpnI-SacIで切断して5' LTRから3' LTRまでを含むDNA断片を切り出し、pGL3 ControlベクターのKpnI-SacI部位へ組み込み、ジーントランスファーベクターpGL3C / 5' LTR. U3G2 / RREc / s / CMV F β -gal / WT3' LTRとした。

また、pEGFPC2 (Clontech) 由来のCMVプロモーター領域とEGFPをコードする領域 (1-1330、5' 端にSacII部位、3' 端にNotI部位とBamHI部位と翻訳ストップコドン(Stop Codon)を付加) をプライマー6Fと6Rを用いてpEGFPC2をテンプレートとしたPCRにより増幅した。4種のPCR断片をそれぞれ制限酵素KpnIとEcoRI、EcoRIとSacII、BamHIとSacI、SacIIとBamHI切断した後に精製し、pBluescript KS+のKpnI-SacIの間に5' LTR→RRE→CMVプロモーターEGFP→3' LTRの順にライゲーションして組み込んだ (pBS/5' LTR. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTR)。プラスミドpBS/5' LTR. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTR をKpnI-SacIで切断して5' LTR-3' LTRを含むDNA断片を調製し、pGL3 Control (Promega) ベクターのKpnI-SacI部位へ組み込み、ベクター(p

GL3C/5' LTR. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTR) を構築した。

<5' LTRの改変>

5' LTRのTATAボックスの下流からgag領域 (9039-9170 + 1-982) を含む断片をプライマー9-1F、2F、3Fと9Rを用いてpSA212をテンプレートとしたPCRで増幅した。サイトメガロウイルス由来のCMV Lプロモーター (pCI (Promega) 由来、1-721) をプライマー10-1Fと10-1Rを用いてPCRにより増幅した。5' LTRのTATAボックス下流を含む断片と、プロモーターを含む断片とを混合し、これをテンプレートとして、プロモーターの5' 側プライマー (10-1F) とLTRの3' 側プライマー (9R) を用いてPCRを行い、プロモーターと5' LTRとのキメラプロモーターのDNA断片を得た。得られたDNA断片をジーントランスファーベクター (pGL3C/5' LTR. U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/WT3' LTR) のKpnI-EcoRI部位に組み込んだ。(pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/WT3' LTR)。同様に、上記のPCRにより得られたDNA断片を、ベクターpGL3C/5' LTR. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTRのKpnI-EcoRI部位にも組み込んだ(pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTR)。

<3' LTRの改変 SIN (self inactivating vector) ベクターの作製>

3' LTRのU3領域 5' 側 27bp と 3' 側 15bp およびR領域を含むDNA断片をプライマー11Fと11Rを用いてpSA212をテンプレートとしたPCRで増幅した。この断片を、前節で得られたキメラプロモーター導入ジーントランスファーベクターpGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/WT3' LTRのSalI-SacI部位に組み込んだ。(pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/3' LTR Δ U3)。同様に、この断片を pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTRのSalI-SacI部位へも組み込み込んだ(pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTR Δ U3)。

<構築したプラスミド調製および構造確認>

プラスミドを定法に従いDH5 α (東洋紡) にトランスフォームし、寒天培地上で培養、出現したコロニーをテンプレートとして、組み込んだDNA断片と、プラスミドの組み込み部位周辺のDNA配列を認識するプライマーを用いてPCRを行った。PC

RにはPLATINUM PCR Supermix (Gibco BRL) を使用した。増幅された産物の有無、サイズをアガロースゲルによる電気泳動で確認し、予想される産物が検出されたクローンを選択し、10mlのLB培地中で培養、QIAprep miniprep Kit (QIAGEN) でプラスミドを精製した。精製したプラスミドを組み込んだDNA断片の両端を切断する制限酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動でDNA断片の大きさを確認した。ここで正しい大きさの断片の組み込みが確認されたクローンについて、100mlのLB培地で培養し、QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。PCRにより増幅した断片を組み込んだプラスミドは、3クローン以上についてシーケンスを行い、pSA212の配列と比較し、変異のないものを選択した。

<ベクター回収>

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり 5×10^5 個でまき、37°C、10% CO₂で48時間カルチャーした。培養液を1ウェルあたり800 μ lのOpti MEMに置換してトランスフェクションに用いた。1ウェルあたり上記のジーントランスファーベクター 300ng、上記のパッケージングベクター 600ng、VSV-G発現プラスミドpVSV-G (Clontech) 100ngを、100 μ lのOpti MEMに溶解後6 μ lのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、4 μ lのLIPOFECTAMINE reagent (Gibco BRL) を加えた100 μ lのOpti MEMを添加し攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーした。1ウェルあたり1mlの20%非働化ウシ血清を含むD-MEMを加え、37°C、10% CO₂で12時間カルチャーした後に、1ウェルあたり2mlの10%非働化ウシ血清を含むD-MEMに培地交換し、24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μ mのフィルターで濾過したものを使用した。

<SIVagmベクターによる遺伝子導入>

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり 5×10^5 個でまき、37°C、10% CO₂で48時間カルチャーした。カルチャーより培養液を除去し、ベクター液にpolybrane (Sigma) を最終濃度8 μ g / mlで添加したものを1

ml重層し、37℃、10% CO₂で3時間カルチャーし、ベクターを感染させた。3時間後に培養液を1ml加え、1日後に培養液を交換した。さらに1日後に、β-Gal発現ベクターの場合は、β-Gal Staining Kit (Invitrogen) を用いてX-galを基質とした染色を行い、標的細胞でのβガラクトシダーゼの発現を光学顕微鏡による検鏡で確認した。EGFP発現ベクターの場合は、蛍光顕微鏡により解析した。

＜ベクターの力価測定＞

ベクターの力価測定は、ベクター液1mlによって遺伝子導入される細胞の数によって計算した。293T細胞を 1×10^6 / plateで6ウェルカルチャープレートにまき、48時間カルチャーした。ここに、上記と同様の方法で1mlのベクター液を感染、感染後48時間後にX-gal染色を行った。光学顕微鏡で200倍の倍率で検鏡、視野内の遺伝子導入細胞数を測定し、3視野の平均を求め、視野の面積とプレートの面積よりもとめた係数854.865をかけることにより力価の算出を行った。力価の単位は Transducing Unit (T.U.) / mlで表記することとした。また、ベクター液に含まれるp27蛋白質量をSIV core antigen EIA kit (Coulter) により定量した。

＜ベクターの評価＞

ジーントランスファーベクターの5' プロモーター活性の増強によってRNAの転写量が増加し、パッケージング効率が上がり、ベクター力価が上昇すると考えられる。そこで、5' プロモーターを置換したベクターの評価は、293T細胞に対する遺伝子導入効率をみることによって行った。前述の方法で遺伝子導入を行い、βガラクトシダーゼの発現をX-gal染色と光学顕微鏡による検鏡で確認した。

3' LTRのプロモーターを欠失させたSINジーントランスファーベクターより、SIN SIVベクターを作製した。同時に従来型の野生型3' LTRをもつジーントランスファーベクターによりSIVベクターを作製し、両者による293T細胞に対する導入力価を比較した。また、p27蛋白質量を測定し、蛋白質あたり導入力価を比較した。また、放射線照射し細胞周期を停止させた293T細胞、レチノイン酸により終末分化させたSH-SY5Y細胞に対するEGFP遺伝子の導入を蛍光顕微鏡による検鏡で確

認した。

<293T細胞に対する遺伝子導入の結果>

SIVagmベクターにより、ヒト胎児腎臓由来細胞293Tに対し β ガラクトシダーゼ遺伝子を導入した。導入細胞をX-galを基質として染色したところ、図5にみられるように青く染色される細胞が検出され、 β ガラクトシダーゼ遺伝子の発現が確認された。実験時の遺伝子導入効率、ベクター液1mlあたり $0.5 \sim 1 \times 10^6$ T.U.であった。またベクター液中のp27量は $0.5 \sim 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ であり、p27量100ngあたりの導入力価は 10^5 T.U.であった。

<SINベクターの性能確認の結果>

SINベクターの導入力価を同一条件で作製した従来の野生型3' LTRをもつベクターと比較した。従来型の力価が $2.4 \sim 2.8$ T.U./ml、SINベクターでは $2.5 \sim 2.9$ T.U./mlであり、従来型の導入力価を100%とした場合SINベクターは105%であった。また導入力価とp27蛋白質量の関係を293T細胞に対する導入力価の測定およびEIAによるp27量の測定により検討したところ、SINベクターではp27 100ngあたり 7×10^5 T.U.であった。

SINベクターにより、細胞周期を停止した293T細胞および終末分化したSH-SY5Y細胞に対するEGFP遺伝子の導入を試みた。293T細胞をDMEM 10% FCS、 37°C 、10% O_2 で培養し、細胞周期を停止させるため、G1-S期停止ではアフィディコリン (Calbiochem-Novabiochem International, Inc.)を最終濃度 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加した (Huberman, J.A. et al., Cell: Vol. 23, 647-648. 1981; Byrnes, J.J., Mol. Cell. Biochem.: Apr, 62(1), :13-24. 1984)。G2-M期停止では、 2×10^7 の細胞に対し、X線を4000rad照射した (Kastan, M.B. et al., Cell: Nov 13, 71(4), : 587-97. 1992)。分裂停止処理後24時間後にコラーゲンIコート6ウェルカルチャープレート (スミロン) に $1 \times 10^6/\text{well}$ でまき、24時間後に遺伝子導入を行った。また、ヒト由来神経芽細胞株SH-SY5Y (Koshizawa, S.H. et al., Cancer Lett.: Jan 1, 111(1-2), 117-25. 1997) を、10%非働化仔ウシ血清を含むRPMI1640、3

7°C、5%CO₂で培養した後、培地に全トランス型レチノイン酸 (SIGMA) を最終濃度5 μ Mで添加し、7日間培養し、その後遺伝子導入を行った (Odelstad, L. et al., Brain Res.: Nov 9, 224(1), 69-82. 1981)。

図6上段は、293T細胞におけるEGFPの発現を蛍光顕微鏡で見たものである。高い効率で遺伝子の発現が認められた。図6下段はSH-SY5YにおけるEGFPの発現を示している。神経細胞に分化していると考えられる、突起を伸長した細胞におけるEGFPの発現が確認された。

本実施例で作製したSIVagmベクターは、培養細胞において高い遺伝子導入能を持つことが確認された。3種の独立したプラスミドのコトランスフェクションによるベクターのパッケージングにおいては、野生型ウイルスの再構成の確率は極めて低いと考えられる。また、ベースであるSIVagmTYO-1は、自然感染および実験的な感染の両方において病原性を示さないことが確認されている (Ohta, Y. et al., Int. J. Cancer: 41, 115-22, 1988; Miura, T. et al., J. Med. Primatol.: 18(3-4), 255-9. 1989; Honjo, S. et al., J. Med. Primatol. 19(1), 9-20, 1990)。さらに、一般にレンチウイルスは種特異性が強く、他種の動物では病原性が低い傾向がある (Novembre, F. J. et al., J. Virol.: 71(5), 4086-91. 1997) ことからベクターの安全性は高いものと考えられる。

本実施例のベクター構築において、パッケージングベクター上からはパッケージングシグナル配列が削除されているため、ウイルス蛋白質をコードするRNAは粒子内にパッケージングされない。また、rev蛋白質はRREに結合し、RNAの細胞質への輸送やスプライシングの抑制などを行うことでウイルス蛋白質の発現、全長RNAのウイルス内への取り込みが行われるため、パッケージングベクターおよびジーントランスファーベクターの双方にRREを組み込んだことにより、パッケージングベクターのmRNAスプライシングが制御され、すべての遺伝子の発現が可能となると考えられる。さらに、ジーントランスファーベクターのmRNAが細胞質に運搬され、ベクター粒子内にパッケージングされると考えられる。vif、vpr / xについ

ては、HIV-1ベクターでは除去している場合もあり (Dull, T. et al., J. Virol. : Nov, 72(11), 8463-71. 1998)、ベクター粒子のパッケージングおよび機能にとって必須ではない可能性がある。vprは非分裂細胞に対する感染性の一因であるとも考えられており (Heinzinger, N. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A: Jul 19, 91(15), 7311-5, 1994)、HIV-1ベクターではvprの有無により遺伝子導入できる細胞が異なるという報告がある (Kim, V. N. et al., J. Virol.: Jan, 72(1), 811-6. 1998)。今回パッケージングベクターから完全に除去したnefは、SIVによる免疫不全症を引き起こす原因の一つであることがサルを用いた感染実験で報告されている (von Gegerfelt, A. S. et al., J. Virol. 73, 6159-65, 1999; Kestler, H. W. 3d., Naidu, Y. N., Kodama, T., King, N. W., Daniel, M. D., Li, Y., Desrosiers, R. C. Use of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus for pathogenesis studies., J. Med. Primatol. 18(3-4): 305-9, 1989)。本実施例で構築したSIVagmベクターではこの配列を完全に除去しているため、仮にパッケージングベクター由来のウイルス遺伝子を含む再構成ウイルス粒子ができたとしても、病原性を持つ危険性がさらに低下していると考えられる。

レンチウイルスをベースとしたベクターは、ベースのウイルスが非分裂状態の細胞に対し感染性を持つことから、細胞周期を停止した培養細胞や神経細胞に対して遺伝子導入能を持つことが期待される (Naldini, L. et al., Science: 272 263-267, 1996; Sutton, R. E. et al., J. Virol., 73(5), 3649-60, 1999)。さらに、VSV-Gによるシュードタイプ化を行ったことにより、感染指向性はベースであるSIVのようにCD4およびケモカインレセプター陽性細胞に限定されない。VSV-Gのレセプターはリン脂質の一種であるホスファチジルセリンであることが知られており、この分子はさまざまな細胞上に存在する (Schlegel, R. et al., Cell, 32(2), 639-46, 1983)。このためVSV-Gによってシュードタイプ化を行ったSIVagmベクターの感染指向性は非常に広い。このベクターを基にヘマグルチニン活

性を有する膜蛋白質によりシェードタイプ化されたウイルスを作製することにより、ほぼすべての動物細胞に高い効率で遺伝子導入が可能となると予想される。

〔実施例6〕 ビロソーム (virosome) の調製

野生型SeV (Z株) のシードを有性卵 (10日卵) に接種し、35.3℃で3日間培養し、漿尿液を回収した。4,000rpm、15分の遠心後、上清を10,000rpm、1時間遠心してウイルスを沈殿させた。BSSに再懸濁して、蔗糖密度勾配 (30%/50%) に重層し、25,000rpm、1時間遠心した。30%と50%蔗糖の界面に形成されたウイルスのバンドを回収し、大量のBSSで希釈した後、9,000rpm、1時間遠心処理してウイルスを沈殿させた。ウイルスはBSSに再懸濁して、-80℃で使用時まで保存した。

得られたセンダイウイルスから、F, HNビリソーム、およびFビリソームを文献 (Bagai et al., 1993, Biochem. Biophys. Acta 1152, 15-25) に従って調製した。すなわち、センダイウイルスを界面活性剤で可溶化した後、不溶性のRNPを遠心除去した。F, HN蛋白質および脂質 (エンベロープ脂質) を含む可溶化液から界面活性剤を除くことにより粒子を再構成させ、F, HNビリソームを調製した。遠心分離前のトリトン X-100 (Triton X-100) の濃度は1% (v/v) である以外は、実施例7と同様の条件で調製した。センダイウイルスを予めDTT (dithiothreitol) 処理し、HN蛋白質を還元した後、上記と同様に界面活性剤で可溶化した。不溶性となったHN蛋白質をRNPと共に遠心除去した。上記と同様に可溶化液から界面活性剤を除くことにより粒子を再構成させ、Fビリソームを調製した。

得られたビリソームは粒子径が不均一であった。そこで、遠心分離 (12000rpm, 10分) により粒子サイズの異なるビリソーム (small virosome: 平均粒子径 140nm、および large virosome: 平均粒子径 1.4 μ m) に分離した。分離されたビリソームをSDS-PAGEで評価した結果、F, HNビリソームではF蛋白質およびHN蛋白質が、FビリソームではF蛋白質が検出され、ほぼ所望のビリソームが得られたことが確認された (図7)。

上記のようにして調製したビリソームまたはUV照射により不活化したセンダイ

ウイルスを、下表の組成で 37°C、2時間の条件で、実施例 7(3)記載の方法により得られた濃縮したEGFP発現SIVウイルスと融合 (fusion) させた。VSV-Gとリボソームとの融合効率は弱酸性で高くなることが報告されていることから、pH条件として pH5.5 および中性で融合を行った (Yamada, S. et al., 1986, Biochemistry, 25, 3703-3708)。

表 3

条件	SIV			SeV		
	力価(TU/ml)	バッファー	容量(μ l)	ウイルス	バッファー	容量(μ l)
1	1×10^8	BSS	50	UV不活化SeV 1×10^9 pfu/ml	BSS	50
2	1×10^8	pH5.5クエン酸	50	UV不活化SeV 1×10^9 pfu/ml	pH5.5クエン酸	50
3	1×10^8	BSS	50	FHNt \cdot OV-A(small)	BSS	50
4	1×10^8	BSS	50	FHNt \cdot OV-A(large)	BSS	50
5	1×10^8	BSS	50	Ft \cdot OV-A(small)	BSS	50
6	1×10^8	BSS	50	Ft \cdot OV-A(large)	BSS	50

上記混合物を HeLa細胞の培養上清にMOI=10で添加した。SIVとセンダイウイルスを単に共存させて感染させる対照実験も行った。この場合、まずSIVを培地に添加し、5分後にセンダイウイルスをSIVの10倍量添加した。培地に添加後、10分、30分、および180分インキュベートして感染させた。時間経過後新鮮な培養液に置換し、感染処理開始の48時間後にGFPの蛍光を観察した (図 8)。

その結果、SIV単独でHeLa細胞に感染させた場合、30分以内の接触では、感染効率が非常に低かった。SIVとUV不活化センダイウイルスを融合させた混合物の場合、SIV単独に比べ、感染が早くなる傾向が認められた。pHは、5.5よりも中性の方が高い感染効率を示した。これは、中性付近がSIVへの影響が少ないことによるのかも知れない。

F, HNピロソームとの融合でも、短時間での感染が促進され、感染効率の有意な

改善が見られた。Fピロソームは、F, HNピロソームよりも感染の改善が小さかった。SIVとセンダイウイルスを単に共存させて感染した場合は、SIV単独とほぼ同じ感染を示したに過ぎなかった。

これらの結果から、センダイウイルスまたはF, HNピロソームとSIVとを融合させることにより、SIVの感染性が上昇することが実証された。また、感染効率の上昇には、センダイウイルスのHN蛋白質の寄与が大きいことが示唆された。

〔実施例7〕 SIV-SeV fusionベクターの調製と評価

(1) 野生型SeVの調製

野生型SeV (Z株) のシードを有性卵 (10日卵) に接種し、35.3℃で3日間培養し、漿尿液を回収した。4,000rpm、15分の遠心後、上清を10,000rpm、1時間遠心してウイルスを沈殿させた。BSSに再懸濁して、蔗糖密度勾配 (30%/50%) に重層し、25,000rpm、1時間遠心した。30%と50%蔗糖の界面に形成されたウイルスのバンドを回収し、大量のBSSで希釈した後、9,000rpm、1時間遠心処理してウイルスを沈殿させた。ウイルスはBSSに再懸濁して、-80℃で使用時まで保存した。

(2) SeV膜蛋白からのピロソームの再構成

1. FHNピロソーム

SeV ($OD_{540}=5$, BSS) 1.8mLに20% (V/V) トリトン X-100/BSS 0.2mLを加え、室温、1時間放置してSeVを可溶化した。実施例6でピロソーム粒子径が不均一であったため、遠心分離前にトリトン X-100濃度を2% (v/v) とした。不溶性のRNPを遠心沈殿させ (100,000×g、1時間、4℃)、F及びHNタンパクの可溶化上清を回収した。上清にバイオビーズ SM-2 (BIORAD) を3回に分けて加え (0.5g×2回、室温1時間、1g×1回、4℃ 15時間 + 室温1時間インキュベーション) 界面活性剤を吸着除去した。ビーズを除き、FHNピロソームを約1.5mL得た。

2. Fピロソーム

SeV ($OD_{540}=5$, BSS) 2mLに30mM ジチオスレイトール/BSS 0.2mLを加え、37℃、2時間処理してHNタンパクを非可逆的に還元した。BSS希釈後、ウイルスを遠心分離

して、1.8mLのBSSに再懸濁した。ウイルス懸濁液に20% (V/V) トリトン X-100/BSSを0.2mL加え、室温、1時間放置してSeVを可溶化した後、不溶性のRNPおよび還元されたHNタンパクを上記同様に除去して、Fタンパクの可溶化上清を回収した。以下FHNビロソームと同様に処理してFビロソームを約1.5mL得た。

3. HNビロソーム

SeV (OD₅₄₀=5、BSS) 2mLに150units/mLのトリプシン (Sigma)/BSS 2mLを加え、37℃、2時間処理してFタンパクを分解した後、1mg/mLのトリプシン-キモトリプシンインヒビター(Sigma)/BSSを加え、反応を停止させた。BSSで希釈後、ウイルスを遠心分離して、1.8mLのBSSに再懸濁した。以下、FHNビロソームと同様に処理して、Fタンパクの機能を不活化させたHNビロソームを約1.5mL得た。

下表に3種のビロソームの特性を示す。FおよびHNタンパクの機能を示すHA活性、溶血活性ならびに電気泳動パターンの結果から所望のビロソームが得られたことが確認された (図9)。

表 4

	FHNビロソーム	Fビロソーム	HNビロソーム
HA	+	-	+
溶血活性	+	-	-
OD ₅₄₀	0.480	0.491	0.470
タンパク濃度 (mg/mL)	0.96	0.57	0.78
平均粒子径 (nm)	143.5	168.9	133.0

(3) SIV-LacZの調製

LacZ遺伝子を搭載したSIV (SIV-LacZ) の調製は以下の3種類のプラスミドを用いた。

- ・ パッケージングベクター : pCAGGS / SIVagm gag-tat / rev

・ ジーントランスファーベクター : pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTR Δ U3 または pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/3LTR Δ U3

・ VSV-Gプラスミド : pVSV-G

パッケージングベクター 150 μ g、ジーントランスファーベクター 300 μ g、VSV-Gプラスミド 50 μ gを75mLのDMEMに溶解した。2mLのPlus reagent (ライフテックオリエンタル (株)) を加えて室温で15分放置した。75mLのDMEMに懸濁した3mLのLipofectAMINE reagent (ライフテックオリエンタル (株)) を加え、室温で15分放置してDNAコンプレックスを形成させた。3mLのDNAコンプレックス溶液を293T細胞 (トランスフェクション2日前に 2.5×10^6 cells/150mm シャーレ \times 50枚, 10% FCS/DMEMで準備) に滴下して、37 $^{\circ}$ C、10% CO₂ 下で3時間トランスフェクションした。10mLの10% FCS/DMEMを加え、さらに培養を続けた。48時間後に培養上清を回収し、0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過し、濾液を42500 \times g 1.5時間遠心してウイルスを沈殿させた。沈殿を併せて15mLの逆転写反応液 (100 μ M dNTPs, 3mM Spermine, 0.3mM Spermidine, 10mM MgCl₂ /TBS) に再懸濁して、37 $^{\circ}$ C、2時間逆転写反応を行った。その後、ウイルスを遠心分離 (42500 \times g, 2時間) し、500 μ LのPBS (5% FCS, 2 μ g/mL ポリブレン含有) に再懸濁してSIV-LacZの濃縮液を得た。SIV-LacZのタイターは約 5×10^8 T.U. /mLであった (293T細胞)。

(4) Fusionベクターの調製

SIV-LacZをBSSで希釈して 1×10^8 T.U. /mLに調製した。この溶液に等容のVirosome/BSS溶液を加え、4 $^{\circ}$ Cで30分静置して吸着させた。その後、37 $^{\circ}$ Cで2時間Fusionを行った後、氷冷したPBSで10倍希釈して (SIV終濃度 5×10^6 T.U. /mL)、直ちに感染実験に用いた。

(5) 感染実験

293T細胞を12wellプレートに 1×10^5 cells/well, 10% FCS/DMEM (以下培地) 1mLでまき、37 $^{\circ}$ C、10%CO₂ 下、48時間培養し、感染直前に培地を0.5mLに減らした。SIVおよびVirosomeとのFusionベクターを 5×10^6 T.U. /mL, 100 μ L/wellで加

え、37℃、10% CO₂ 下で10分間感染を行った。培地で2回洗浄した後、2mLの培地を加え培養を続けた。48時間後に細胞をPBSで2回洗浄後、細胞溶解液（ピカジーンLC-β；東洋インキ製造（株））0.25mLで溶解した。12,000rpm、3分遠心分離を行い、上清を適宜希釈して、LacZ遺伝子の発現量をGalacto-Light Plus™ (TROPIX, Inc.)を用いて測定した。結果は細胞蛋白1μg当たりのLacZ相対活性(RLU/μg protein)を3例の平均値±標準誤差で示した。

FHN-VirosomeでFusionすることによりLacZ発現量がSIV単独に比べて有意に増加した(p<0.05)。F-Virosomeの場合、FHNで認められた遺伝子発現の上昇は得られなかった。HN-Virosomeでも上昇する傾向が認められたが、その度合いはFHNに比べると小さかった(図10)。

上記ベクターにおいては、Fusionの役割を担うタンパクとして、SIVのVSV-GおよびVirosomeのFタンパクが存在する。VSV-GタンパクのFusionは弱酸性pH域に至適値があり、一方Fタンパクは中性域でもFusion可能であることが報告されている。本実施例では、Fusionを中性pHで行っていることから、主としてSeVのFタンパクがFusionのメインを担っていると考えられる。SeVとリボソームのFusionではFタンパクの機能が保持されていれば成立することが報告されている。そこで、FHN及びF-VirosomeのFusion効率と同程度と仮定すると、FHN-Virosomeのみで遺伝子発現の上昇が認められたのは付加されたHNの寄与が大きいと推測された。HN-Virosomeでも若干の効果が見られたことから、VSV-G側からのFusionもある程度生じ、HNタンパクがSIVに付与されたと推測された。

一方、単純にSIVとVirosomeを共存させたときには、SIV単独と同程度であった(図10)。このことから、両者を混合して37℃で反応させることによりFusionが成立し、SIVのエンベロープ上にSeVの膜タンパクが付加され、主にHNタンパクの寄与により感染速度が向上したと考えられた。

〔実施例8〕 HNシュードタイプレンチウイルスベクターの調製および性能解析

1. 細胞培養

293T細胞（ヒト胎児腎臓由来細胞株）は、10%非働化仔ウシ血清（BIO WHITTA KER）を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 高グルコース（Gibco BRL）を用いて、37℃、10%CO₂で培養した。

2. ベクターの作製

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり 5×10^5 個でまき、 37°C 、10% CO_2 で48時間カルチャーした。培養液を1ウェルあたり800 μl の1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。1ウェルあたりジーントランスファーベクター (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/C MVFEGFP/3LTR Δ U3 または pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/3LTR Δ U3) 1200 ng、パッケージングベクター (pCAGGS / SIVagm gag-tat / rev) 360ng、VSV-G 発現プラスミド pVSV-G (Clontech) 120ng、Sendai virus HN、F、およびM蛋白発現プラスミド pCAGGS-HN、pCAGGS-F および pCAGGS-M をそれぞれ240ngを、以下の表5のような組み合わせで100 μl のOpti MEMに溶解後6 μl のPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、100 μl のOpti MEMで希釈した4 μl のLIPOFECTAMINE Reagent (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、 37°C 、10% CO_2 下で3時間カルチャーした。1ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミンおよび15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、 37°C 、10% CO_2 で、48時間培養後に培養上清を回収、0.45 μm のフィルターで濾過したものをベクター浮遊液とした。

表 5

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫
PV												
GTV												
VSV-G												
HN												
F												
M												

(表中、加えたプラスミドを黒で示した。「PV」はパッケージングベクター pCAGGS / SIVagm gag-tat / rev、「GTV」はジーントランスファーベクター pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTR Δ U3 または pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/3LTR Δ U3、「VSV-G」は VSV-G発現プラスミド pVSV-G、そして、「HN」、「F」および「M」はそれぞれセンダイウイルスHN、F、およびM蛋白発現プラスミド pCAGGS-HN、pCAGGS-F および pCAGGS-M を示す)

3. ベクターの大量調製および濃縮

293T細胞を15cmのプラスチックシャーレへ1枚あたり 5×10^6 個でまき、37°C、10% CO₂で48時間カルチャーした。培養液を1ウェルあたり10mlの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。シャーレ1枚あたりジーントランスファーベクター 8 μ g、パッケージングベクター 2.4 μ g、VSV-G発現プラスミド pVSV-G (Clontech) 0.8 μ g、Sendai virus HNおよびF蛋白発現プラスミド pCAGGS-HN、pCAGGS-FおよびpCAGGS-M をそれぞれ 1.6 μ gを、上記の表5の組み合わせで1.5mlのOpti MEMに溶解後、40 μ lのPLUS Reagent (Gibco BRL)を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、60 μ lのLIPOFECTAMINE Reagent (Gibco BRL)を添加した1.5mlのOpti MEMを加え攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C、10% CO₂下で3時間カルチャーした。シャーレ1枚あたり10mlの1%ウシ血清アルブミンおよび15 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL)を含むDMEMを加え、37°C、10% CO₂で、48時間培養した。培養上清を回収、0.45 μ mのフィルターで濾過し、42,490 \times g (TOMY SRX-201, TA21BH)、4°C、90分遠心した。ペレットを1/100量の逆転写反応液(TBS, 10mM MgCl₂, 3mM SPERMINE, 0.3nM SUPERMIDINE, 100mM dNTPs)に溶解し、37°Cで2時間反応させた。逆転写反応後、42,490 \times g (TOMY SRX-201, TA21BH)、4°C、2時間遠心し、ペレットをPBS(5% FCS, 2 μ g/ml polybrene)に溶解し、使用まで-80°Cに保存した。

パッケージングベクター、ジーントランスファーベクターおよび外殻蛋白発現

ベクターの3種のプラスミドを細胞にコトランスフェクションすると、ジーントランスファーベクターのmRNAが転写され、パッケージングベクターより供給されるウイルス蛋白により Ψ 配列が認識されることによりベクター粒子内にRNAがパッケージングされる。次に、外殻蛋白発現ベクターにより供給されるエンベロープ蛋白によってシュードタイプ化され、ベクター粒子が完成する。作製したシュードタイプウイルスベクターを供試して細胞に対する遺伝子導入について検討した。

<ベクターの力価測定および導入細胞の検出>

293T細胞を供試し、前述の方法によりベクターによる遺伝子導入を実施した。ベクター液1mlによって遺伝子導入される細胞の数によって力価を算出した。また、レポーター遺伝子としてEGFPをコードしたジーントランスファーベクターを供試した場合は、標的細胞を2%ホルムアルデヒドおよび0.2%グルタルアルデヒドを含むPBS(Invitrogen社)で室温20分間固定し、PBSで1回洗浄後に蛍光倒立型顕微鏡(DMIRB(SLR)、ライカ)で鏡検してEGFPの発現を検索した。

パッケージングベクター (pCAGGS / SIVagm gag-tat / rev)、ジーントランスファーベクター (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTR Δ U3) およびSendai virus由来の外殻蛋白発現ベクター (pCAGGS-F, pCAGGS-HN, および pCAGGS-M) の3種のプラスミドを、表5の②～⑤のような組み合わせで細胞にコトランスフェクションした結果、いずれの場合も293T細胞への遺伝子導入は認められなかった。しかしながら、VSV-Gを共発現させることにより遺伝子導入が認められた。これらの結果より、FおよびHN蛋白のみではシュードタイプSIVagmベクターの十分な遺伝子導入効率は得られないが、VSV-Gなどのヒト細胞感染性ウイルスのエンベロープ蛋白質を共存させることにより高い感染力を持つシュードタイプウイルスベクターが生産されることが判明した。

シュードタイプSIVagmベクターにより、293T細胞に対しEGFP遺伝子を導入し、ベクターの力価を測定した結果、作製したウイルスベクターの力価は、ベクター

液1mlあたり $0.5 \sim 1 \times 10^5$ T.U.であった。さらに、遠心により濃縮したウイルスベクターの力価は、濃縮により 1.0×10^7 T.U./mlと高い値を示した。この結果から、センダイウイルス由来FおよびHN蛋白によりシュードタイプ化したSIVagmベクターが遠心により濃縮可能であることが示された。

〔実施例9〕 シュードタイプウイルスベクターのインビボ投与

従来のウイルスベクターにより遺伝子導入が困難であるとされている気管上皮粘膜細胞においては、導入時に物理的障害を取り除く処理がされており、VSV-GシュードタイプHIVベクターを用いた遺伝子導入では二酸化硫黄などにより傷害しないと十分な効果が認められていない (L. G. Johnson et al., Gene Therapy : 7, 568-574. 2000)。センダイウイルス由来FおよびHN蛋白によりシュードタイプ化したSIVagmベクターは、傷害を与える必要なく気管上皮粘膜細胞に効率よく遺伝子を導入することができるか否かを検証した。

6週齢の C57BL/6 マウス (オス) をseboflurene 吸入麻酔下に、上記のように製造したEGFPを発現するFHNシュードタイプSIVベクター (表5の“⑩”のEGFP発現ベクター) (SIV-F/HN/M-EGFPと称す) を経鼻的に投与した。組織は OCT compound にて凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡 (Zeiss) で観察した。

SIV-F/HN/M-EGFP 10^8 T.U. を鼻より $100 \mu\text{l}$ 投与し、3日目の気管を観察したところ、気管上皮細胞にEGFPの蛍光が観察された (図11)。また、同じ個体の鼻中隔粘膜においても、粘膜上皮に発現が観察され、多列線毛上皮にも蛍光が認められた (図12)。

〔実施例10〕 シュードタイプウイルスベクターのインビボ投与における長期間の外来遺伝子発現

EGFPを発現するジーントランスフェーベクターを用いて、上記と同様に FおよびHN蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスを製造した。具体的には、表2の“⑨”に相当するシュードタイプMSCV (MSCV-F/HN/M-EGFP) および表5の“⑩”に相当するシュードタイプSIV (SIV-F/HN/M-EGFP) を製造した。対照として、

表5の“①”に相当するVSV-GシュードタイプSIV (SIV-VSV-EGFP) を用いた。マウスに経鼻的にこれらのEGFP発現ウイルスベクターを投与し、投与90日後に鼻粘膜組織切片を作製し、EGFPの発現を観察した。

その結果、いずれのベクターにおいてもEGFPの発現が観察されたが、F, HN蛋白を持つ MSCV-F/HN/M-EGFP および SIV-F/HN/M-EGFPの投与においてEGFPの強い蛍光が確認された。特に、SIV-F/HN/M-EGFPベクター投与した場合には他のベクターに比べ強い蛍光が観察され、このベクターが高い遺伝子導入能を有することが確認された (図13)。

[実施例11] 新規センダイウイルスエンベロープ蛋白発現プラスミドの構築 ①細胞質側領域置換型HN発現プラスミドの構築

HN蛋白の細胞質側領域をSIVエンベロープ蛋白の細胞質側領域に置換したHN発現プラスミドを構築した (図14)。3組の合成オリゴヌクレオチド(Xho+Xma/Xma-Xho、Xma+131/135-Xma、132+Bam/Bam-136)をアニーリング後、順にpBluescript KS+ (Stratagene) のXhoI-BamHI部位へ組み込んだ。pCAGGS (Gene, vol.108, p.p.193-200, 1991) のXhoI-Bsu36I部位に前記組み換えプラスミドをXhoIとDraIIIで切断した合成オリゴヌクレオチド連結断片を精製したもの、HN蛋白発現プラスミドpCAGGS-HNをDraIIIとBsu36Iで切断したHN蛋白3'側を含む断片を精製したものを組み込んだ。以上の方法により得られたプラスミドをSIV細胞質側領域置換型HN発現プラスミドpCAGGS-SIVct/HNとした。

②SIV細胞質側領域付加型HN発現プラスミドの構築

SIVエンベロープ蛋白の細胞質側領域をHN蛋白に付加したHN発現プラスミドを構築した (図15)。SIVエンベロープ蛋白の細胞質側と一部のHN蛋白を含む領域を上記細胞質側領域置換型HN発現プラスミドをテンプレートとし、プライマーFS IVhnおよびRhnsIVを用いたPCRにより増幅した。増幅断片をXhoIおよびAccIにより切断後、上記①にて作製した3組の合成オリゴヌクレオチドを組み込んだpBluescript KS+ (Stratagene) のXhoI-AccI部位へ組み、SIVエンベロープの細胞質側領

域を含む断片と置換した。

この組み換えプラスミドをXhoIとDraIIIで切断した合成オリゴヌクレオチド連結断片を精製したもの、HN蛋白発現プラスミドpCAGGS-HNをDraIIIとBsu36Iで切断したHN蛋白3'側を含む断片をpCAGGS (Gene, vol. 108, pp. 193-200, 1991) のXhoI-Bsu36I部位に組み込んだ。以上の方法により得られたプラスミドをSIV細胞質側領域付加型HN発現プラスミドpCAGGS-SIVct+HNとした。

③細胞質側領域欠失型F蛋白発現プラスミドの構築

F蛋白細胞質側領域のアミノ酸を5'側より27、14および4個残し、それぞれ15、28および38個のアミノ酸を欠失させたF蛋白発現プラスミドを構築した (図16)。F蛋白の全領域をpBluescript KS+ (Stratagene) のSmaI部位へ組み込んだプラスミドpBluescript KS+/SmaI/Fをテンプレートとし、15、28および38アミノ酸欠失型をそれぞれプライマーXhFFとNotF1650、NotF1611およびNotF1581を用いたPCRにより増幅した。増幅断片をXhoIおよびNotIにより切断後、pCAGGS (Gene, vol. 108, pp. 193-200, 1991) のEcoRI部位にXhoI/NotIリンカーを組み込んだプラスミドのXhoI-NotI部位に組み、プラスミド (15アミノ酸欠失型: pCAGGS-Fct27、28アミノ酸欠失型: pCAGGS-Fct14および38アミノ酸欠失型: pCAGGS-Fct4) を構築した。

④SIV細胞質側領域を付加した細胞質側領域欠失型F蛋白発現プラスミドの構築

細胞質側領域欠失型F蛋白 (F蛋白細胞質側領域のアミノ酸数は③で作製したプラスミドと同数) にSIV細胞質側領域5'側より11アミノ酸 (SIVct11) を付加したプラスミドを構築した (図17)。F蛋白の全領域をpBluescript KS+ (Stratagene) のSmaI部位へ組み込んだプラスミドpBluescript KS+/SmaI/Fをテンプレートとし、上記3種のアミノ酸欠失型にSIV細胞質側領域を付加したものをそれぞれプライマーXhFFとSA-F1650、SA-F1611およびSA-F1581を用いたPCRにより増幅した。増幅断片をXhoIおよびNotIにより切断後、pCAGGS (Gene, vol. 108, pp. 193-200, 1991) のEcoRI部位にXhoI/NotIリンカーを組み込んだプラスミドのXhoI-NotI部

位に組み、プラスミド (SIVct11付加15アミノ酸欠失型: pCAGGS-Fct27/SIVct11、SIVct11付加28アミノ酸欠失型: pCAGGS-Fct14/SIVct11およびSIVct11付加38アミノ酸欠失型: pCAGGS-Fct4/SIVct11) を構築した。

〔実施例12〕 センダイウイルスエンベロープシュードタイプレンチウイルスベクターの調製および性能解析

<細胞培養>

293T細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞株) は、10%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 高グルコース (Gibco BRL) を用いて、37°C、10%CO₂で培養した。

BEAS-2B細胞 (ヒト気管上皮由来細胞株) は、10%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含む Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco BRL) とRPMI1640を 1:1 の比率で混合したものを用いて、37°C、5%CO₂で培養した。

<ベクターの作製>

293T細胞を 6 ウェルのプラスチックカルチャープレートへ 1 ウェルあたり 5×10⁵個でまき、37°C、10% CO₂で48時間カルチャーした。培養液を 1 ウェルあたり 800μlの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。1 ウェルあたりジーントランスファーベクター (pGL3C/CMV.L.U3G2/RREc/s/CMV.F.EGFP/3LTRΔU3) 1200ng、パッケージングベクター (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) 360ng、Sendai virus HN、F蛋白発現プラスミドpCAGGS-SIVct/HN、pCAGGS-SIVct+HN、pCAGGS-Fct4、pCAGGS-Fct14、pCAGGS-Fct27、pCAGGS-Fct4/SIVct11、pCAGGS-Fct14/SIVct11 および pCAGGS-Fct27/SIVct11をそれぞれ以下の表 6 に示す組み合わせで100μlのOpti MEM (Gibco BRL) に溶解後 6μlのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、100μlのOpti MEMで希釈した4μlのLIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーした。1 ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミンおよび15

$\mu\text{g/ml}$ のトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、 37°C 、 $10\% \text{CO}_2$ で16～24時間カルチャーした後に、1 ウェルあたり2mlの1%ウシ血清アルブミンおよび $7.5 \mu\text{g/ml}$ のトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMに培地交換し、その24時間培養後に培養上清を回収、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過したものを使用した。

表 6

		HN蛋白発現プラスミド		
		pCAGGS-HN	pCAGGS-SIVct/HN	pCAGGS-SIVct+HN
F蛋白発現 プラスミド	pCAGGS-Fct4	○	○	○
	pCAGGS-Fct14	○	○	○
	pCAGGS-Fct27	○	○	○
	PCAGGS-Fct4/SIVct11	○	○	○
	PCAGGS-Fct14/SIVct11	○	○	○
	PCAGGS-Fct27/SIVct11	○	○	○

<SIVagmベクターによる遺伝子導入>

標的となる293TおよびBEAS-2B細胞を6 ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1 ウェルあたり 1×10^6 個でまき、 37°C 、 $10\% \text{CO}_2$ で293T細胞は48時間、BEAS-2B細胞は24時間カルチャーした。カルチャープレートより培養液を除去し、ベクター液にポリブレン (Sigma) を最終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ で添加したものを1ml重層し、 37°C で293T細胞は 10% 、BEAS-2B細胞 $5\% \text{CO}_2$ で3時間カルチャーし、ベクターを感染させた。3時間後に20%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含む培養液を1ml加え、 37°C で293T細胞は 10% 、BEAS-2B細胞 $5\% \text{CO}_2$ で48時間培養した。

<ベクターの力価測定>

ベクターの力価測定は、ベクター液1mlによって遺伝子導入される細胞の数によって計算した。上記の方法で1mlのベクター液を感染、感染後48時間後に2%ホルムアルデヒドおよび0.2%グルタルアルデヒドを含むPBS (Invitrogen社) で室温20分間固定し、PBSで1回洗浄後に蛍光倒立型顕微鏡 (DMIRB(SLR)、ライカ) にて200倍の倍率で検鏡、視野内の遺伝子導入細胞数を測定し、3視野の平均を求め、

視野の面積とプレート面積よりもとめた係数 854.865 をかけることにより力価の算出を行った。力価の単位は Transducing Unit (T.U.)/ml で表記することとした。

<ベクターの大量調製および濃縮>

293T細胞を15cmのプラスチックシャーレへ1枚あたり 5×10^6 個でまき、37°C、10% CO₂で48時間カルチャーした。培養液をシャーレ1枚あたり10mlの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。シャーレ1枚あたりジーントランスファーベクター (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF LacZ/3LTRΔU3) 8 μg、パッケージングベクター (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) 2.4 μg、Sendai virus HN蛋白発現プラスミド pCAGGS-SIVct+HN およびF蛋白発現プラスミド pCAGGS-Fct4 をそれぞれ1.6 μgを1.5mlのOpti MEM (Gibco BRL) に溶解後、40 μlのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、1.5mlのOpti MEMで希釈した60 μlのLIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーした。シャーレ1枚あたり10mlの1%ウシ血清アルブミンおよび15 μg/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、37°C、10% CO₂で16~24時間カルチャーした後に、シャーレ1枚あたり20mlの1%ウシ血清アルブミンおよび7.5 μg/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMに培地交換し、その24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μmのフィルターで濾過した。16,000×g (Beckman J-25I、JA-18)、4°C、1時間遠心した。ペレットをPBS (5%FCS、2 μg/mlポリブレンを含む) に溶解し、-80°Cで保存した。

<結果>

ジーントランスファーベクター (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3)、パッケージングベクター (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) および Sendai virus HN (pCAGGS-SIVct/HNまたはpCAGGS-SIVct+HN)、F蛋白発現プラスミド (pCAGGS-Fct4、pCAGGS-Fct14、pCAGGS-Fct27、pCAGGS-Fct4/SIVct11、pCAGGS-Fct14/S

IVct11、pCAGGS-Fct27/SIVct11) を組み合わせて細胞にコトランスフェクションした結果、293TおよびBEAS-2B細胞への遺伝子導入が認められ(図18、19および20)、HNおよびF蛋白発現プラスミドにおける改変によりVSV-Gを共発現させることなく遺伝子導入が認められることから、Sendai virus FおよびHN蛋白によるSIVagmをベースとしたシュードタイプレンチウイルスベクターの作製が可能であることが示された。これらシュードタイプベクターの293T細胞を用いた力価は約 3.6×10^4 T.U./mlであり、F蛋白発現プラスミドにおいてはpCAGGS-Fct4およびFct4/SIVct11を用いた場合が最も高く、これら2種のF蛋白発現プラスミドとHN蛋白発現プラスミド3種との組み合わせにおいては、HN蛋白発現プラスミドpCAGGS-SIVct+HNとの組み合わせで最も高かった。

最もベクター力価の高かったF蛋白発現プラスミドpCAGGS-Fct4およびHN蛋白発現プラスミドpCAGGS-SIVct+HNをコトランスフェクションして作製したベクターについて遠心による濃縮について検討した。その結果、F、HNシュードタイプベクターは遠心により高度の濃縮が可能であることが確認された(図21)。

<供試したオリゴヌクレオチド>

合成オリゴヌクレオチドは、SA-F1611およびSA-F1581を除き(株)グライナージャパンDNA受託合成事業部に依頼し、日本製粉(株)生物化学研究部にて合成、逆相カートリッジ精製またはPAGE精製したものを使用した。SA-F1611およびSA-F1581は、(株)サワディー・テクノロジーに依頼し、HPLC精製したものを使用した。

Xho+Xma : 5'-TCGAGATGTGGTCTGAGTTAAAAATCAGGAGCAACGACGGAGGTGAAGGACCAGACGCCAACGACCC (配列番号: 25)

Xma-Xho : 5'-CCGGGGGTCGTTGGCGTCTGGTCCTTCACCTCCGTCGTTGCTCCTGATTTTAACTCAGACCACATC (配列番号: 26)

Xma+131: 5'-CCGGGGAAAGGGGGTGCAACACATCCATATCCAGCCATCTCTACCTGTTTATGGACAGA (配列番号: 27)

135-Xma : 5'-ACCCTCTGTCCATAAACAGGTAGAGATGGCTGGATATGGATGTGTTGCACCCCCTTTCC
(配列番号 : 28)

132+Bam : 5'-GGGTTAGGTGGTTGCTGATTCTCTCATTACCCAGTGGG (配列番号 : 29)

Bam-136 : 5'-GATCCCCACTGGGTGAATGAGAGAATCAGCAACCACCTA (配列番号 : 30)

FSIVhn : 5'-GAGACTCGAGATGTGGTCTGAGTTAAAAATCAGG-3' (配列番号 : 31)

RhnSIV : 5' AGAGGTAGACCAGTACGAGTCACGTTTGGCCCTATCACCATCCCTAACCCCTGTGCCATAA
AC-3' (配列番号 : 32)

XhFF : 5'-CCGCTCGAGCATGACAGCATATATCCAGAGA (配列番号 : 33)

NotF1650 : 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCATCTGATCTTCGGCTCTAATGT (配列番号 : 34)

NotF1611 : 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCAACGGTCATCTGGATTACCCAT (配列番号 : 35)

NotF1581 : 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCACCTTCTGAGTCTATAAAGCAC (配列番号 : 36)

SA-F1650 : 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTATGGAGATAGAGGAACATATCCCTGCCTAACCCCTTCTGAT
CTTCGGCTCTAATGT (配列番号 : 37)

SA-F1611 : 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTATGGAGATAGAGGAACATATCCCTGCCTAACCCCTACGGTC
ATCTGGATTACCCAT (配列番号 : 38)

SA-F1581 : 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTATGGAGATAGAGGAACATATCCCTGCCTAACCCCTCCTTCT
GAGTCTATAAAGCAC (配列番号 : 39)

[実施例13] センダイウイルスエンベロープシュードタイプレトロウイルス
ベクターの調製および性能解析

<細胞培養>

293T細胞（ヒト胎児腎臓由来細胞株）は、10%非働化仔ウシ血清（BIO WHITTA
KER）を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 高グルコース（Gibco
BRL）を用いて、37℃、10%CO₂で培養した。

<ベクターの作製>

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり5×1
0⁵個でまき、37℃、10% CO₂で48時間カルチャーした。培養液を1ウェルあたり80

0 μ lの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。1ウェルあたりジーントランスファーベクターpMSCV EGFP 700ng、エクトロピックエンベロープおよびgag-pol発現プラスミド (IMGENEX社) 300ng、Senda i virus F蛋白発現プラスミドpCAGGS-Fct4 200ng、HN蛋白発現プラスミドpCAGGS-HN、pCAGGS-SIVct/HNおよびpCAGGS-SIVct+HN 200ngをそれぞれ以下の表7に示す組み合わせで100 μ lのOpti MEM (Gibco BRL) に溶解後6 μ lのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、100 μ lのOpti MEMで希釈した4 μ lのLIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーした。1ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミンおよび15 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、37°C、10% CO₂で16~24時間カルチャーした後に、1ウェルあたり2mlの1%ウシ血清アルブミンおよび7.5 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMに培地交換し、その24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μ mのフィルターで濾過したものを使用した。

表7

		HN蛋白発現プラスミド		
		pCAGGS-HN	pCAGGS-SIVct/HN	pCAGGS-SIVct+HN
F蛋白発現プラスミド	pCAGGS-Fct4	○	○	○

<SIVagmベクターによる遺伝子導入>

標的となる293Tを6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり1 $\times 10^5$ 個でまき、37°C、10%CO₂で48時間カルチャーした。カルチャープレートより培養液を除去し、ベクター液にポリブレン (Sigma) を最終濃度8 μ g/mlで添加したものを1ml重層し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーし、ベクターを感染させた。3時間後に20%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含む培養液を1ml加え、37°C、10% CO₂で48時間培養した。

<ベクターの力価測定>

ベクターの力価測定は、ベクター液1mlによって遺伝子導入される細胞の数によって計算した。上記の方法で1mlのベクター液を感染、感染後48時間後に2%ホルムアルデヒドおよび0.2%グルタルアルデヒドを含むPBS (Invitrogen社) で室温20分間固定し、PBSで1回洗浄後に蛍光倒立型顕微鏡 (DMIRB (SLR)、ライカ) にて200倍の倍率で検鏡、視野内の遺伝子導入細胞数を測定し、3視野の平均を求め、視野の面積とプレートの面積よりもとめた係数854.865をかけることにより力価の算出を行った。力価の単位は Transducing Unit (T.U.)/mlで表記することとした。

<結果>

ジーントランスファーベクターpMSCV EGFP、エコトロピックエンベロープおよびgag-pol発現プラスミド、Sendai virus F蛋白発現プラスミドpCAGGS-Fct4、HN蛋白発現プラスミドpCAGGS-HN、pCAGGS-SIVct/HNおよびpCAGGS-SIVct+HNを組み合わせて細胞にコトランスフェクションした結果、293T細胞への遺伝子導入が認められた (図22)。HNおよびF蛋白発現プラスミドにおける改変により、エコトロピックエンベロープを保有するウイルスが感染性を示さないヒト由来293T細胞に対し遺伝子導入が認められることから、Sendai virus FおよびHN蛋白によるMSCVをベースとしたシュードタイプレトロウイルスベクターの作製が可能であることが示された。さらにF蛋白発現プラスミドにpCAGGS-Fct4を用いた場合、シュードタイプレトロウイルスベクターの力価は、HN蛋白発現プラスミド3種との組み合わせにおいてHN蛋白発現プラスミドpCAGGS-SIVct+HNとの組み合わせで最も高く、 1.1×10^5 T.U./mlであった。

【実施例14】 VSV-G/HNシュードタイプレンチウイルスベクターの生産および造血幹細胞を含むヒト骨髓細胞に対する遺伝子導入効率のVSV-Gシュードタイプレンチウイルスベクターとの比較

<細胞培養>

293T細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞株) は、10%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTA

KER)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 高グルコース (Gibco BRL) を用いて、37°C、10%CO₂で培養した。

<ベクターの力価測定>

ベクターの力価測定は、ベクター液1mlによって遺伝子導入される細胞の数によって計算した。上記の方法で1mlのベクター液を感染、感染後48時間後に2%ホルムアルデヒドおよび0.2%グルタルアルデヒドを含むPBS (Invitrogen社) で室温20分間固定し、PBSで1回洗浄後に蛍光倒立型顕微鏡 (DMIRB (SLR)、ライカ) にて200倍の倍率で検鏡、視野内の遺伝子導入細胞数を測定し、3視野の平均を求め、視野の面積とプレートの面積よりもとめた係数854.865をかけることにより力価の算出を行った。力価の単位は Transducing Unit (T.U.)/mlで表記することとした。

<ベクターの大量調製および濃縮>

293T細胞を15cmのプラスチックシャーレへ1枚あたり 5×10^6 個でまき、37°C、10% CO₂で48時間カルチャーした。培養液をシャーレ1枚あたり10mlのDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。シャーレ1枚あたりジーントランスファーベクター (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3) 8μg、パッケージングベクター (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) 2.4μg、VSV-G発現プラスミドpVSV-GとSendai virus HN蛋白発現プラスミドpCAGGS-HN、pCAGGS-SIVct/HNおよびpCAGGS-SIVct+HN 1.6μgの3種を以下の表8に記載の組み合わせで1.5mlのOpti MEM (Gibco BRL) に溶解後、40μlのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、1.5mlのOpti MEMで希釈した60μlのLIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーした。シャーレ1枚あたり20mlの20%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含むDMEMを加え、37°C、10% CO₂で16~24時間カルチャーした後に、シャーレ1枚あたり20mlの非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含むDMEMに培地交換し、その24時間培養後に培養上清を回

収、0.45 μ mのフィルターで濾過した。42,390 \times g (TOMY SRX-201, TA21BH)、4 $^{\circ}$ C、90分遠心した。ペレットを1/100の逆転写反応液 (TBS, 10mM MgCl₂, 3mM SPERMINE, 0.3nM SUPERMIDINE, 100mM dNTPs) に溶解し、37 $^{\circ}$ C、2時間反応させた。逆転写反応後、42,390 \times g (TOMY SRX-201, TA21BH)、4 $^{\circ}$ C、2時間遠心し、ペレットをPBS (5%FCS、2 μ g/mlポリブレンを含む) に溶解し、使用まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

表 8

	pCAGGS-HN	pCAGGS-SIVct/HN	pCAGGS-SIVct+HN
pVSV-G	○	○	○

<ヒト骨髓CD34⁺細胞への遺伝子導入>

ヒト骨髓CD34⁺細胞はBIO WHITTAKER社より購入した。解凍後、50ng/ml IL-6、100ng/ml TPO、100ng/ml Stem Cell Factor (GIBCO BRL)、100ng/ml Flt-3リガンド (Reserch Diagnostics, Flanders, NJ) (いずれもヒトリコンビナント)、10%FCS添加イスコフ変法DMEM (IMDM) にて37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で48時間培養した。培養後、細胞2 \times 10⁵個に対し、ウイルスベクターを2 \times 10⁶および10⁷ T.U./mlで調製したウイルス液に交換し、50ng/ml IL-6、100ng/ml TPO、100ng/ml Stem Cell Factor (GIBCO BRL)、100ng/ml Flt-3リガンドを添加した。培養開始96時間後に細胞を回収した。

<フローサイトメーターによる解析>

回収した細胞はPE標識抗ヒトCD34抗体 (Becton Dickinson) を用いて染色した後、フローサイトメーター (EPICS ELITE、Coulter) にてGFPおよびPEの2蛍光により解析した。

<結果>

m. o. i.=10においてVSV-GシュードタイプベクターのCD34⁺ 細胞におけるGFP陽性細胞の比率が9.7%であったのに対し、VSV-GとHN、SIVct/HNおよびSIVct+HNとのシュードタイプベクターのCD34⁺ 細胞におけるGFP陽性細胞の比率はそれぞれ43.9、25.2および19.7%であった (表 9)。一方、m. o. i.=50においてはVSV-Gシュー

ドタイプベクターのCD34⁺細胞におけるGFP陽性細胞の比率は51.4%であり、VSV-GとHN、SIVct/HNおよびSIVct+HNとのシュードタイプベクターのCD34⁺細胞におけるGFP陽性細胞の比率はそれぞれ43.0、70.8および68.4%であった(表10)。

以上の結果より、VSV-G蛋白に加えHN蛋白を共発現させることにより作製したシュードタイプベクターは造血幹細胞を含むヒト骨髓細胞に対する遺伝子導入の効率が上昇することが確認された。

表9 GFP陽性細胞の比率(%) m.o.i.=10

	VSV-G	VSV-G/HN	VSV-G/SIVct/HN	VSV-G/SIVct+HN
CD34 ⁺	9.7	43.9	25.2	19.7
CD34 ⁻	16.7	8.0	0.3	0.2

表10 GFP陽性細胞の比率(%) m.o.i.=50

	VSV-G	VSV-G/HN	VSV-G/SIVct/HN	VSV-G/SIVct+HN
CD34 ⁺	51.4	43.0	70.8	68.4
CD34 ⁻	0.2	0.6	0.3	0.2

〔実施例15〕 インフルエンザウイルスエンベロープ蛋白発現プラスミドの構築

インフルエンザウイルス(H1N1)由来ヘムアグルチニン蛋白(HA)発現プラスミドを構築した。プラスミドpDREF HisD (Microbiol. Immunol., 44(8), 677-685, 2000)をテンプレートとし、プライマーHAFNotおよびHARNotを用いたPCRにより増幅した。増幅断片をNotIにより切断後、pCAGGS (Gene, vol.108, pp.193-200, 1991)にXhoI-NotI部位を付加したベクターのNotI部位に組み込んだ。以上の方法により得られたプラスミドをHA蛋白発現プラスミドpCAGGS-HAとした。

供試した合成オリゴヌクレオチドは、(株)グライナーージャパンDNA受託合成事業部に依頼し、日本製粉(株)生物化学研究部にて合成、逆相カートリッジ精製またはPAGE精製したものを使用した。

HAFNot : 5'-GAGAGCGGCCGCCCAAAATGAAGGCAAACTACTG-3' (配列番号 : 48)

HARNot: 5'-GATGCGGCCGCTCAGATGCATATTCTGCAC-3' (配列番号 : 49)

〔実施例16〕 インフルエンザウイルスエンベロープシュードタイプレンチウイルスベクターの調製および性能解析

<細胞培養>

293T細胞（ヒト胎児腎臓由来細胞株）は、10%非働化仔ウシ血清（BIO WHITTAKER）を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 高グルコース（Gibco BRL）を用いて、37℃、10%CO₂で培養した。

<ベクターの作製>

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり5×10⁵個でまき、37℃、10% CO₂で48時間カルチャーした。培養液を1ウェルあたり800μlの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。1ウェルあたりジーントランスファーベクター(pGL3C/CMV.L.U3G2/RREc/s/CMV.F.EGFP/3LTRΔU3) 1200ng、パッケージングベクター(pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) 360ng、HA蛋白発現プラスミドpCAGGS-HA 240ngを100μlのOpti MEM (Gibco BRL) に溶解後6μlのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、100μlのOpti MEMで希釈した4μlのLIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37℃、10% CO₂で3時間カルチャーした。1ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミンおよび10μg/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、37℃、10% CO₂で16～24時間カルチャーした後に、1ウェルあたり2mlの1%ウシ血清アルブミン、5μg/mlのトリプシン (Gibco BRL) および50unitのノイラミニダーゼ(Roche)を含むDMEMに培地交換し、その24時間培養後に培養上清を回収、0.45μmのフィルターで濾過したものを使用した。

<SIVagmベクターによる遺伝子導入>

標的となる293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェル

あたり 1×10^6 個でまき、 37°C 、10% CO_2 で48時間 カルチャーした。カルチャープレートより培養液を除去し、ベクター液にポリブレン (Sigma) を最終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ で添加したものを1ml重層し、 37°C 、10% CO_2 で3時間カルチャーし、ベクターを感染させた。3時間後に20%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含む培養液を1ml加え、 37°C 、10% CO_2 で48時間培養した。

<ベクターの力価測定>

ベクターの力価測定は、ベクター液1mlによって遺伝子導入される細胞の数によって計算した。上記の方法で1mlのベクター液を感染、感染後48時間後に2%ホルムアルデヒドおよび0.2%グルタルアルデヒドを含むPBS (Invitrogen社) で室温20分間固定し、PBSで1回洗浄後に蛍光倒立型顕微鏡 (DMIRB (SLR)、ライカ) にて200倍の倍率で検鏡、視野内の遺伝子導入細胞数を測定し、3視野の平均を求め、視野の面積とプレートの面積よりもとめた係数854.865をかけることにより力価の算出を行った。力価の単位は Transducing Unit (T.U.) /mlで表記することとした。

<ベクターの大量調製および濃縮>

293T細胞を15cmのプラスチックシャーレへ1枚あたり 5×10^6 個でまき、 37°C 、10% CO_2 で48時間カルチャーした。培養液をシャーレ1枚あたり10mlの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。シャーレ1枚あたりジーントランスファベクター (pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF LacZ/3LTR Δ U3) $8 \mu\text{g}$ 、パッケージングベクター (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) $2.4 \mu\text{g}$ 、HA蛋白発現プラスミド pCAGGS-HA $1.6 \mu\text{g}$ を1.5mlのOpti MEM (Gibco BRL) に溶解後、40 μl のPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、1.5mlのOpti MEMで希釈した60 μl のLIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、 37°C 、10% CO_2 で3時間カルチャーした。シャーレ1枚あたり10mlの1%ウシ血清アルブミンおよび $10 \mu\text{g/ml}$ のトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、37

℃、10% CO₂で16～24時間カルチャーした後に、シャーレ1枚あたり20mlの1%ウシ血清アルブミン、5 μg/mlのトリプシン (Gibco BRL) および500unitのノイラミニダーゼ (Roche) を含むDMEMに培地交換し、その24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μmのフィルターで濾過した。16,000×g (Beckman J-25I、JA-18)、4℃、1時間遠心した。ペレットをPBS (5%FCS、2 μg / mlポリブレンを含む) に溶解し、-80℃で保存した。

<結果>

ジーントランスファーベクター (pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3)、パッケージングベクター (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) およびHA蛋白発現プラスミド (pCAGGS-HA) を細胞にコトランスフェクションした結果、293T細胞への遺伝子導入が認められ (図23)、VSV-Gを共発現させることなく遺伝子導入が認められることから、Influenza virus HA蛋白によるSIVagmをベースとしたシュードタイプレンチウイルスベクターの作製が可能であることが示された。これらシュードタイプベクターの293T細胞を用いた力価は 1.3×10^4 T.U. /mlであった。さらに、このようにして作製したベクターについて遠心による濃縮について検討した結果、HAシュードタイプベクターは遠心により高度の濃縮が可能であることが確認された (図24)。

[実施例17] インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルスエンベロープシュードタイプレンチウイルスベクターの調製および性能解析

<細胞培養>

293T細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞株) は、10%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 高グルコース (Gibco BRL) を用いて、37℃、10%CO₂で培養した。

<ベクターの作製>

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり 5×10^5 個でまき、37℃、10% CO₂で48時間カルチャーした。培養液を1ウェルあたり80

0 μ lの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。1ウェルあたりジーントランスファーベクター(pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTR Δ U3)1200ng、パッケージングベクター(pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev)360ng、Sendai virus HN蛋白発現プラスミドpCAGGS-HN、pCAGGS-SIVct/HN、pCAGGS-SIVct+HNおよびHA蛋白発現プラスミド240ngをそれぞれ以下の表11に示す組み合わせで100 μ lのOpti MEM (Gibco BRL) に溶解後6 μ lのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した。これに、100 μ lのOpti MEMで希釈した4 μ lのLIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーした。1ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミンおよび10 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、37°C、10% CO₂で16~24時間カルチャーした後に、1ウェルあたり2mlの1%ウシ血清アルブミン、5 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) および50unitのノイラミニダーゼ (Roche) を含むDMEMに培地交換し、その24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μ mのフィルターで濾過したものを使用した。

表 1 1

		HN蛋白発現プラスミド		
		pCAGGS-HN	pCAGGS-SIVct/HN	pCAGGS-SIVct+HN
HA蛋白発現プラスミド	pCAGGS-HA	○	○	○

<結果>

ジーントランスファーベクター(pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTR Δ U3)、パッケージングベクター(pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev)、HA蛋白発現プラスミド(pCAGGS-HA)およびSendai virus HN蛋白発現プラスミド(pCAGGS-HN、pCAGGS-SIVct/HN、pCAGGS-SIVct+HN)を細胞にコトランスフェクションした結果、293T細胞への遺伝子導入が認められた(図25)。Influenza virusのbuddingにおけるシアル酸との結合を切断する役割をノイラミニダーゼが担っているため、HAシュード

タイプ作製にノイラミニダーゼが必要であった。そこで、Sendai virus HN蛋白のノイラミニダーゼ活性を利用する目的で各種HN発現プラスミドを用いてHN蛋白を共存させたところ、ベクター産生が認められた。この結果から、新規のHA/HNシェードタイプレンチウイルスベクターの作製が可能であることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明により、ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質でシェードタイプ化されたレトロウイルスベクターが提供された。本発明のベクターは、遺伝子治療などに好適に用いられる。殊に、気道へのインビボ投与、および造血幹細胞を標的としたエクスビボ投与に有用である。

請求の範囲

1. ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含む、実質的に純粋なシュードタイプレトロウイルスベクター。
2. ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質が一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスに含まれるヘマグルチニン活性を有する蛋白質に由来する、請求項1に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
3. ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質がパラミクソウイルスのHN蛋白質および/またはオルトミクソウイルスHA蛋白質に由来する、請求項2に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
4. ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質が一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスに含まれるヘマグルチニン活性を有する蛋白質の細胞質側領域の一部または全部が置換、欠失、および/または付加により改変された蛋白質である、請求項2に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
5. パラミクソウイルスのF蛋白質をさらに含む、請求項1から3のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
6. 該F蛋白質の細胞質側領域の一部または全部が欠失および/または付加により改変されている、請求項5に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
7. ヒト細胞に感染するウイルスに由来するエンベロープ蛋白質をさらに含む、請求項1から6のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
8. レトロウイルス由来のアンフォトロピックエンベロープ蛋白質を含む、請求項7に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
9. 水疱性口内炎ウイルス由来のVSV-G蛋白質を含む、請求項7または8に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
10. レトロウイルスベクターがオンコウイルスに由来する、請求項1から9のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。

- 1 1. レトロウイルスベクターがレンチウイルスに由来する、請求項 1 から 9 のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
- 1 2. レンチウイルスがサル免疫不全ウイルスに由来する、請求項 1 1 に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
- 1 3. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項 3 または 5 に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
- 1 4. 外来遺伝子を発現可能に含む、請求項 1 から 1 3 のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
- 1 5. 粘液を有する細胞への遺伝子導入用である、請求項 1 4 に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
- 1 6. 粘液を有する細胞が粘膜上皮細胞である、請求項 1 5 に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
- 1 7. 粘膜上皮細胞が鼻腔または肺の気管支の粘膜上皮細胞である、請求項 1 6 に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
- 1 8. 血球系または造血系細胞への遺伝子導入用である、請求項 1 4 に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
- 1 9. 血球系または造血系細胞が造血幹細胞である、請求項 1 8 に記載のシュードタイプレトロウイルスベクター。
- 2 0. 請求項 1 4 から 1 9 のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクターを含む遺伝子導入用組成物。
- 2 1. 医薬である、請求項 2 0 に記載の組成物。
- 2 2. 請求項 1 4 から 1 9 のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクターを細胞に接触させる工程を含む、外来遺伝子を細胞に導入する方法。
- 2 3. ヘマグルチニン活性を有する蛋白質をコードする DNA を発現可能に含む、請求項 1 から 1 9 のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクターの産生用パッケージング細胞。

24. 請求項1から19のいずれかに記載のシュードタイプレトロウイルスベクターの製造方法であって、請求項23に記載のパッケージング細胞内でレトロウイルス由来のジーントランスファーベクターDNAを転写させる工程を含む方法。

図 1

293T/MSCV(FCS 不含)

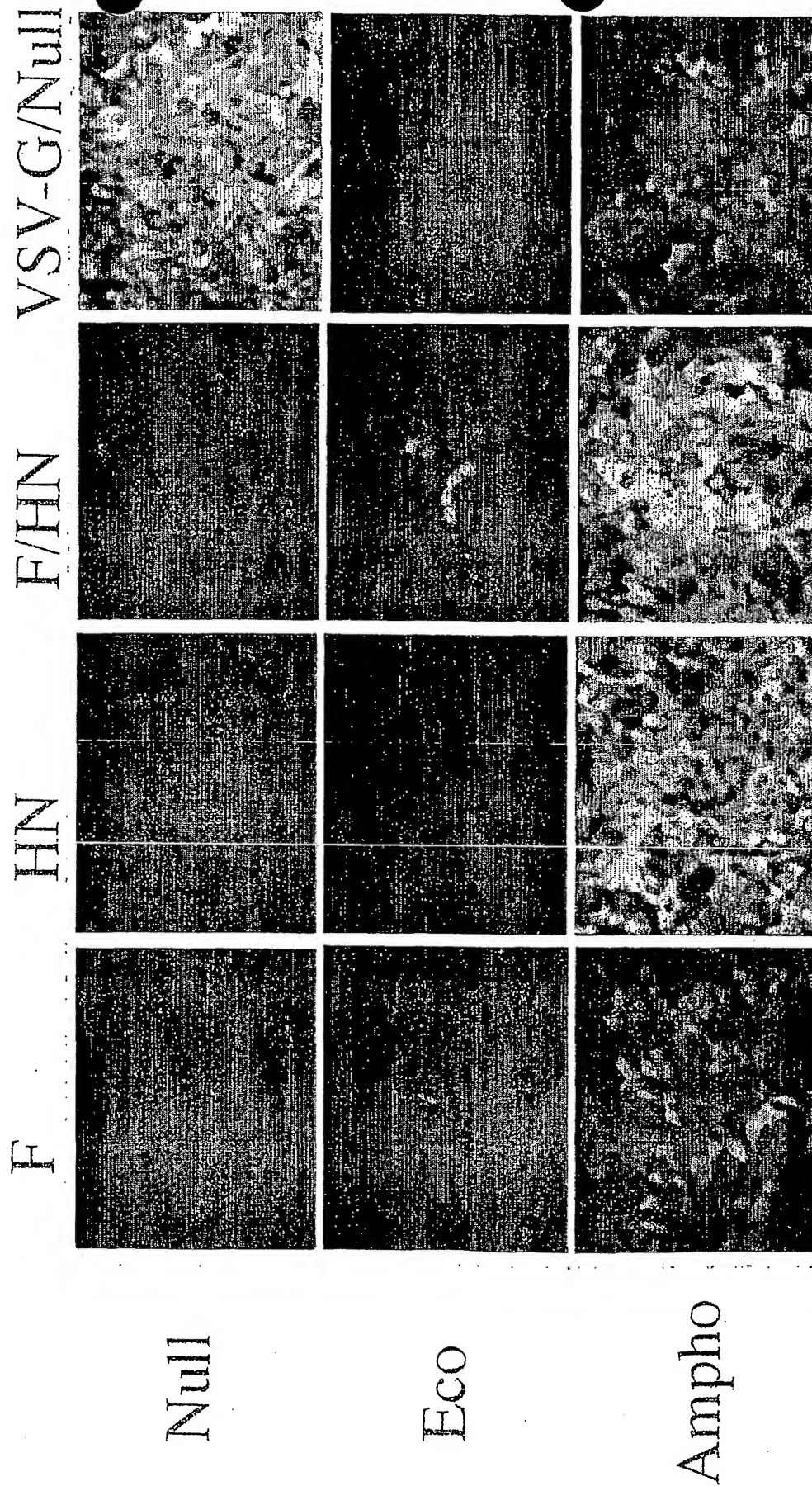


図 2

2 / 25

HAアッセイ

Ampho-Retro

6:6:0

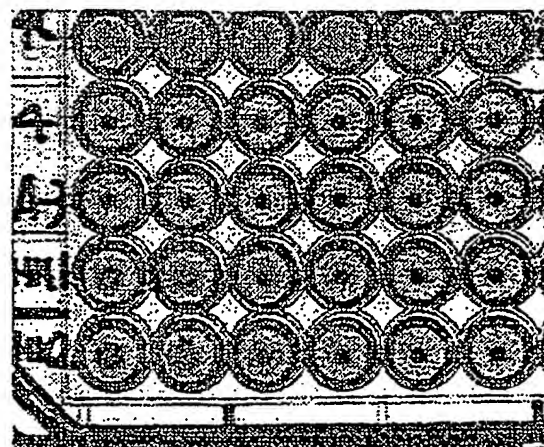
7:5:0

HN-Ampho-Retro

7:3:2

5.6:2.4:4

(MSCV:AMPHO:HN)



希釈倍率 2 4 8 16 20

3 / 25

図 3

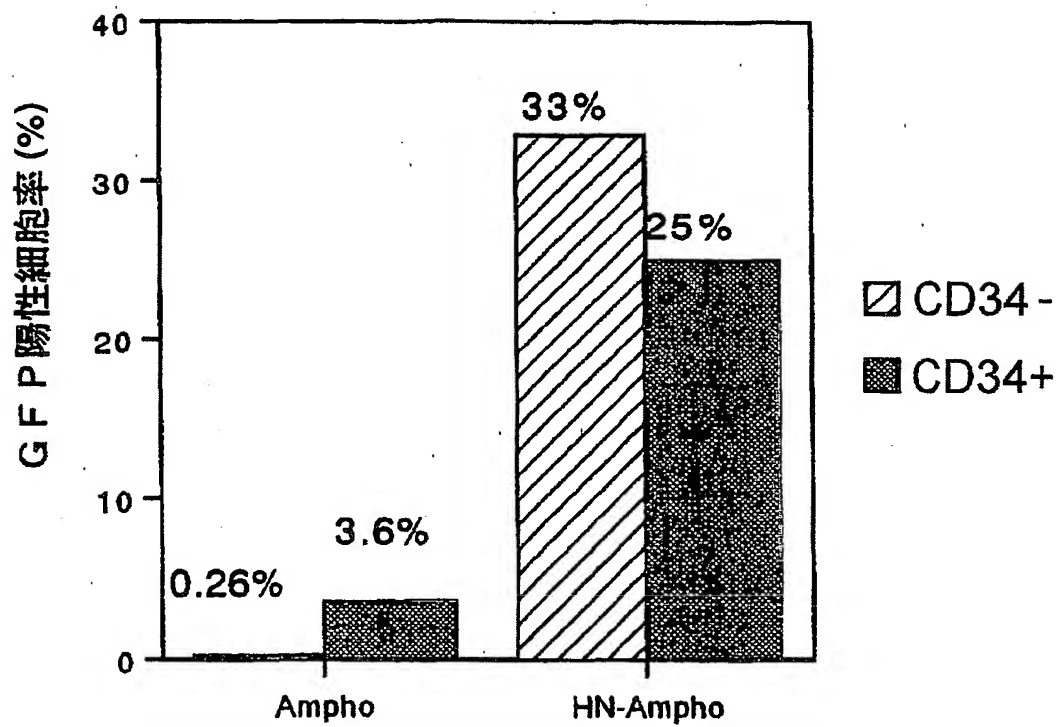
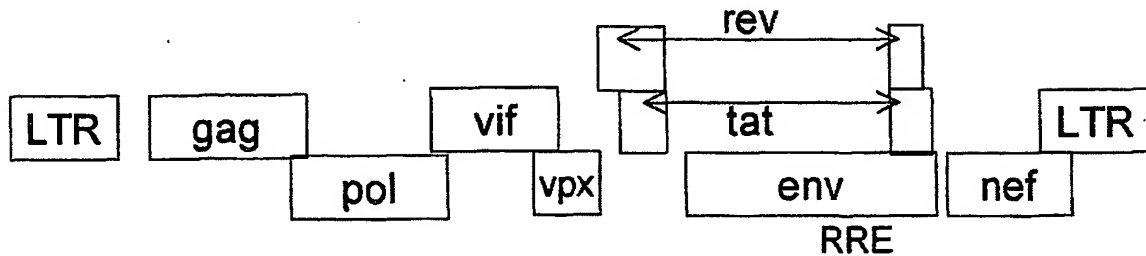
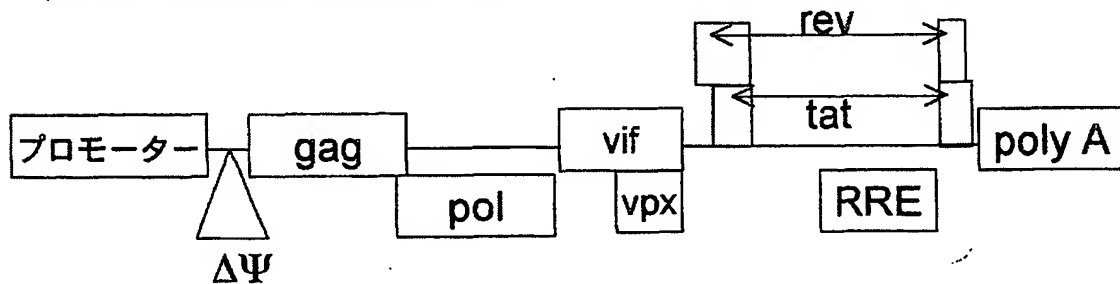
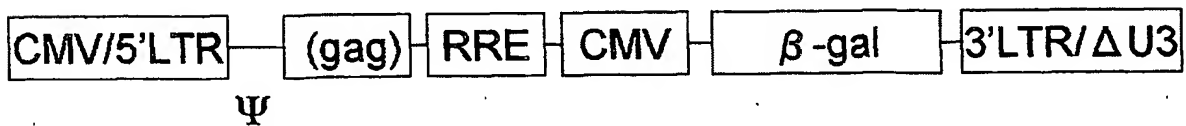
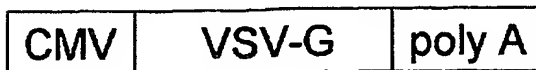


図 4

a. SIVagmゲノム SIVagm provirus genome pSA212

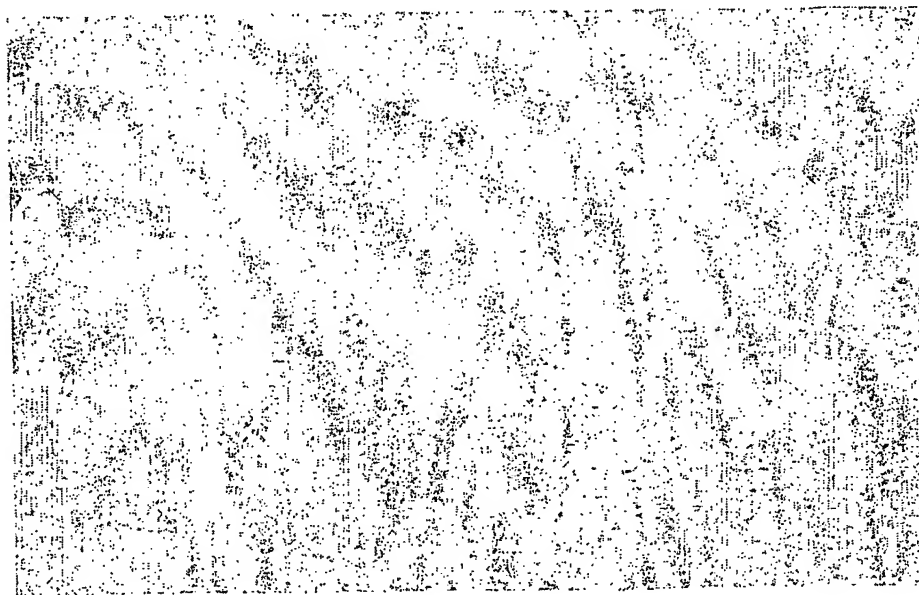
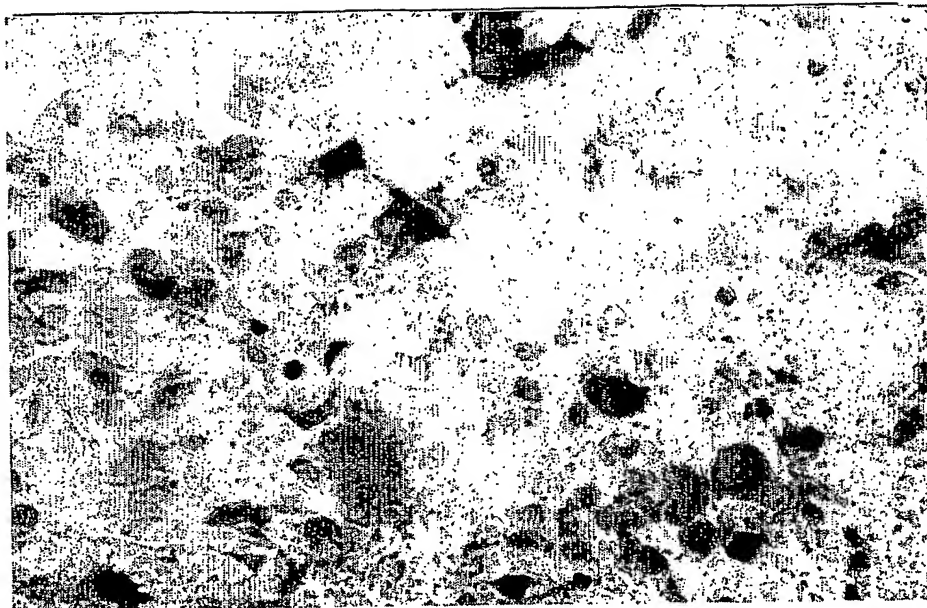
b. パッケージングベクター Packaging Vector
pCAG / SIVagm gag-tat / revc. ジーントランスファーベクター Gene Transfer Vector
pGL3C / CMVL. U3G2 / RREc/s / CMVF β-gal / 3'LTR ΔU3

d. VSV-G供給ベクター pVSV-G



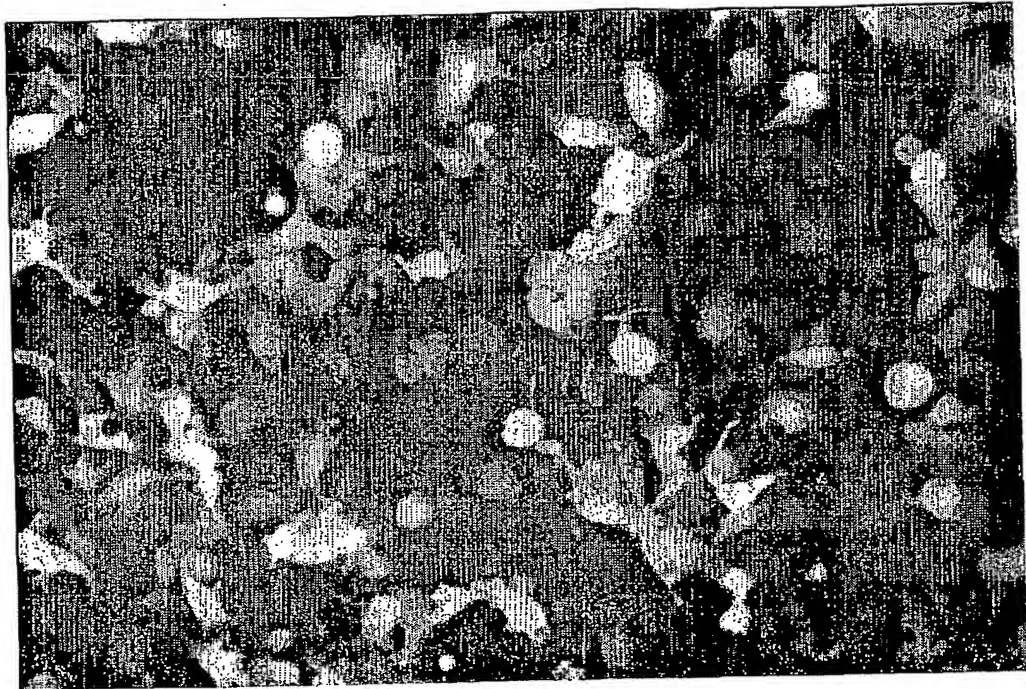
5 / 25

図 5



6 / 2 5

図 6



7 / 25

図 7

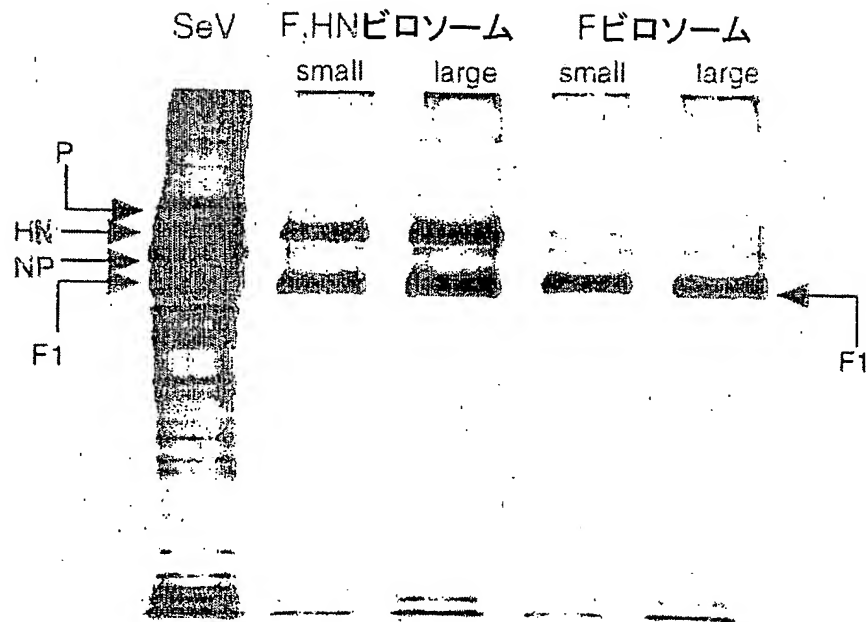
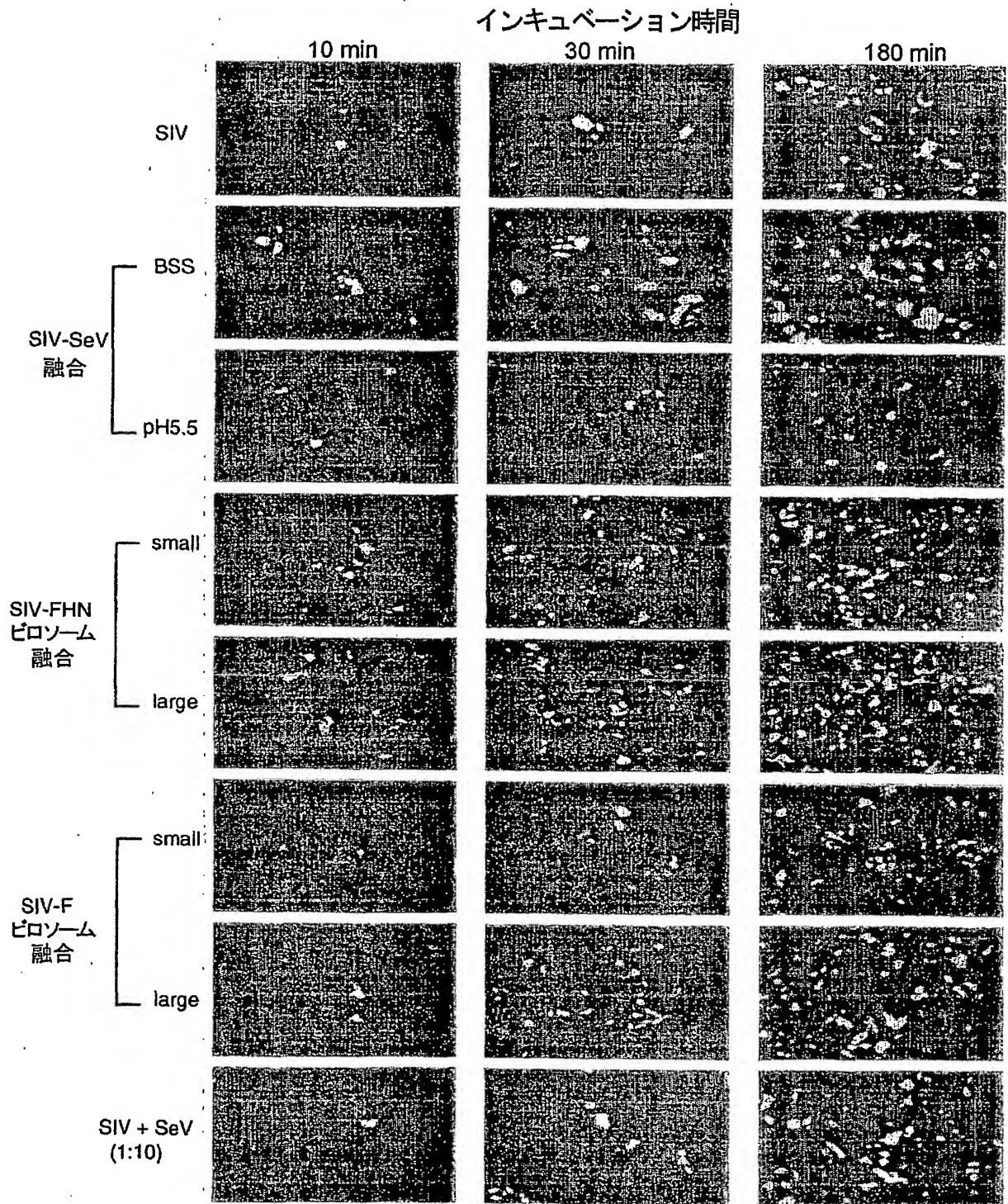


図 8



9 / 25

☒ 9

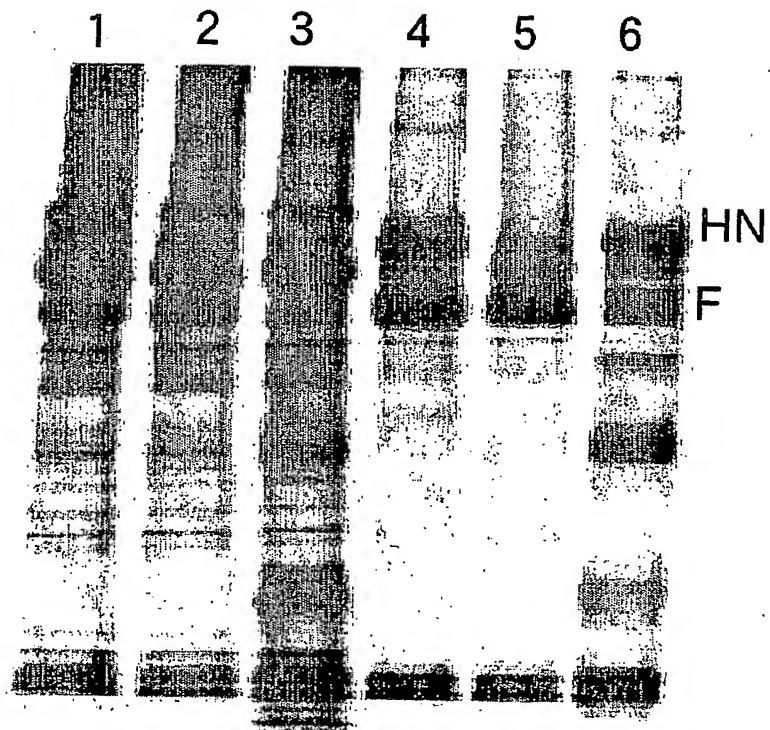
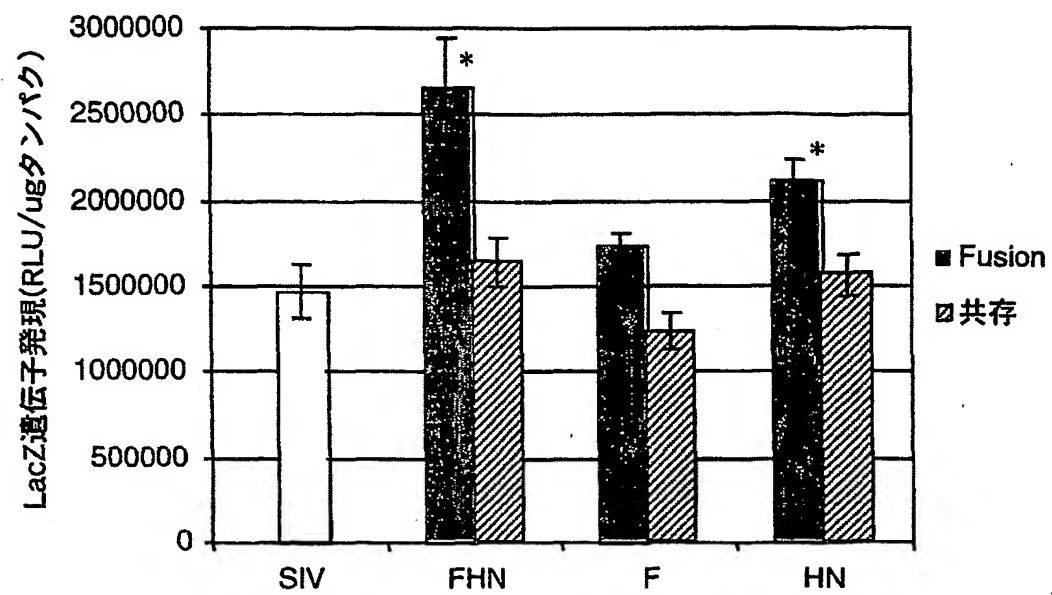
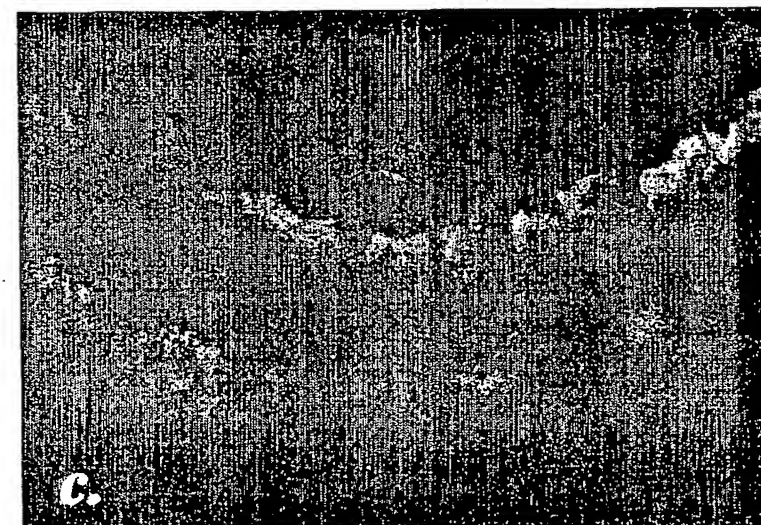
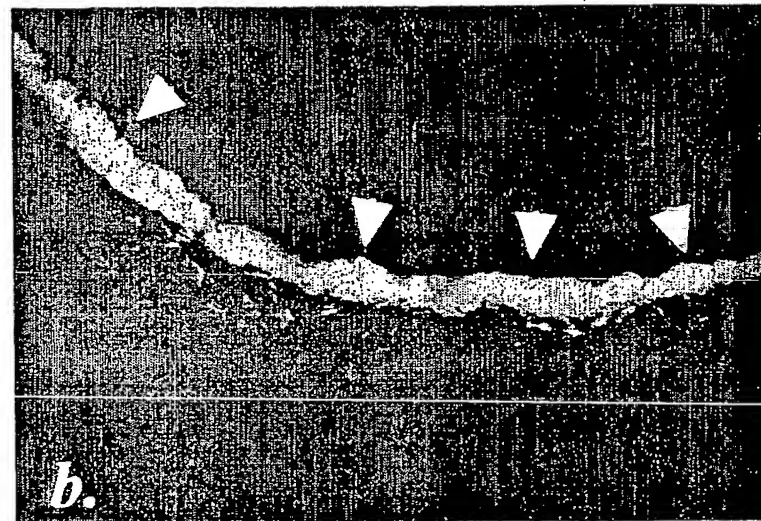


図 10



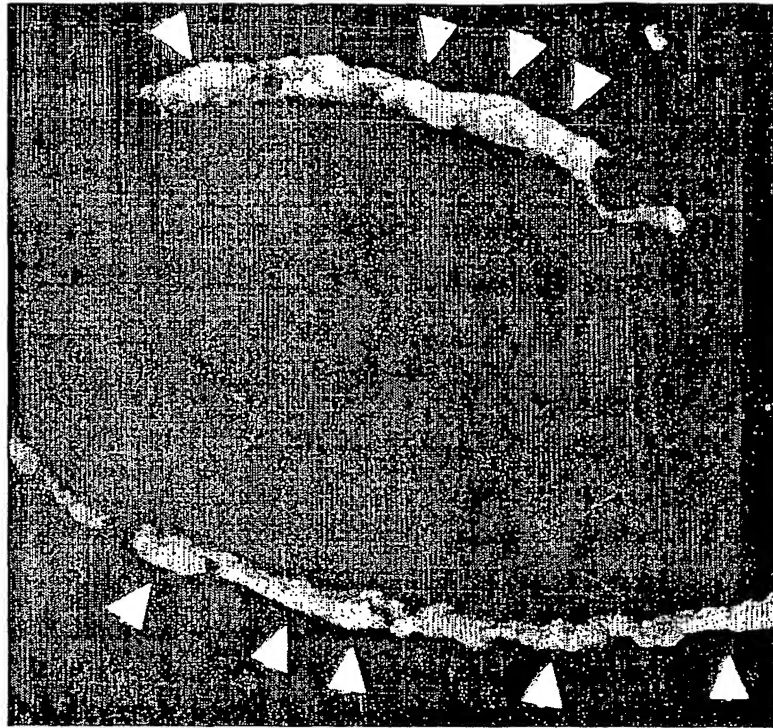
11/25

図 11



12/25

図 12



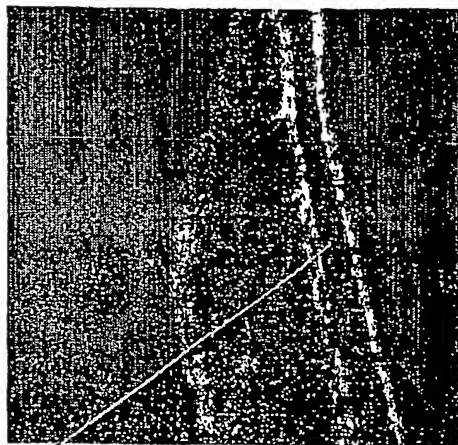
b. GFP発現
SIV-F/HNM-M-EGFP 10^8 pfu
(a. の連続切片)



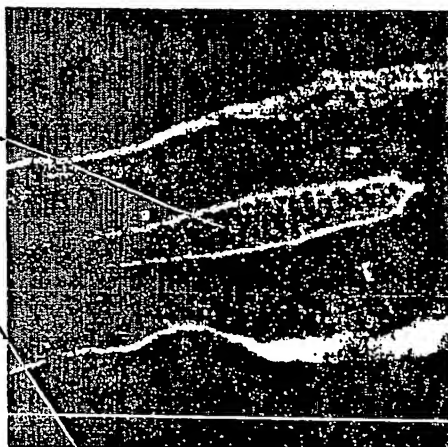
a. マウス鼻中隔粘膜
(H.E. 染色)

図 13

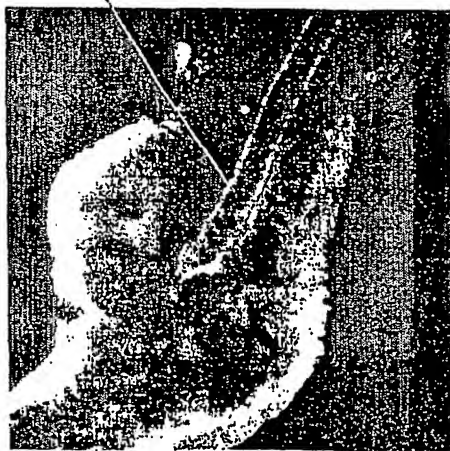
鼻中隔软骨



SIV-VSV-EGFP



MSCV-F/HN/M-EGFP



SIV-F/HN/M-EGFP

14 / 25

☒ 14

SIVct/HN WSELKIRSNDGGEGPEDANDPRGKGVQHIHIQPSLPVYGQVRVR WLLILSFTQ

xxx:SIV細胞質側領域

xxx:HN蛋白膜貫通領域

15 / 25

☒ 15

SIVct+HN · WSELKIRSNDGGEGPEDANDPRGKGVQHIHIQPSLPVYGQVRVR DGDRGKRDS

XXX:SIV細胞質側領域

XXX:HN蛋白細胞質側領域

16 / 25

図 16

F_{ct 4} VVIIVIIIIVLYRLRR

4

F_{ct14} VVIIVIIIIVLYRLRRSMLMGNPDDR

14

F_{ct27} VVIIVIIIIVLYRLRRSMLMGNPDDRIPRDTYITLEPKIR

27

XXX:F蛋白膜貫通領域

XXX:F蛋白細胞質側領域

17/25

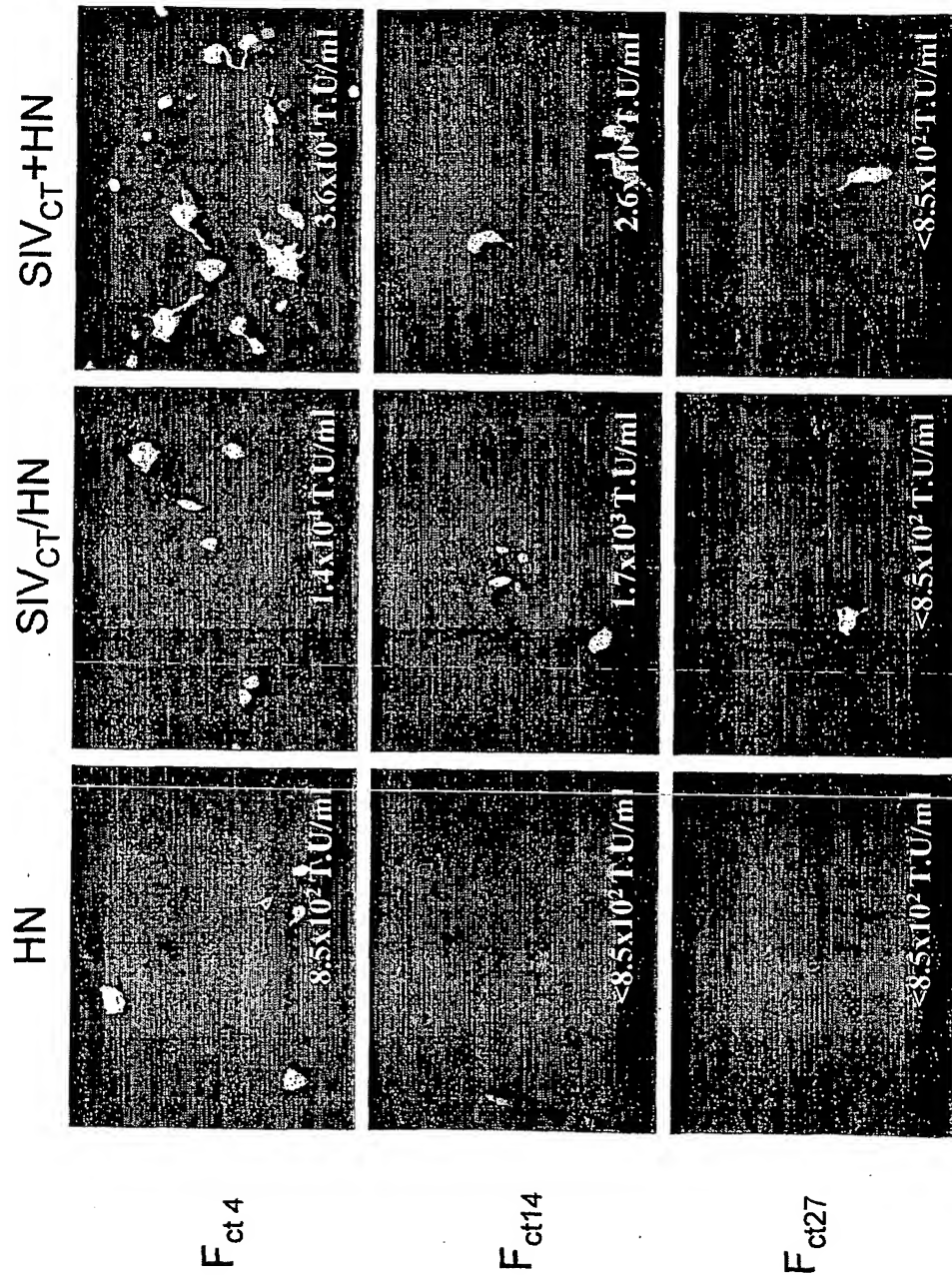
図 17

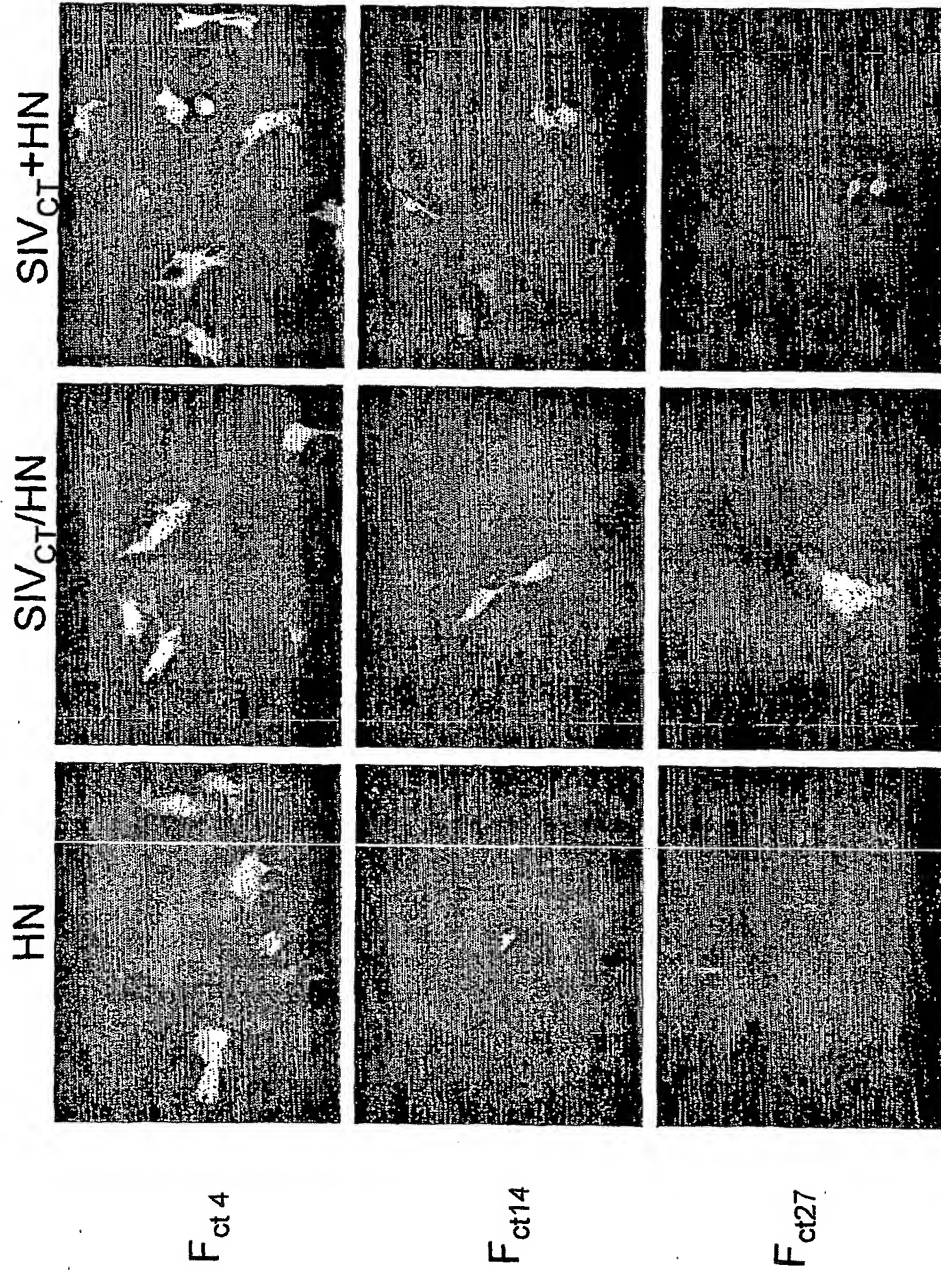
 F_{ct4}/SIV_{ct11} *VVIIVIIIVLYRLRR* *RVRQGYVPLSP* F_{ct14}/SIV_{ct11} *VVIIVIIIVLYRLRRSMLMGNPDDR* *RVRQGYVPLSP* F_{ct27}/SIV_{ct11} *VVIIVIIIVLYRLRRSMLMGNPDDRIPRDTYITLEPKIR* *RVRQGYVPLSP*

XXX: F蛋白膜貫通領域

XXX: F蛋白細胞質側領域

XXX: SIV細胞質側領域11アミノ酸(SIV_{ct11})





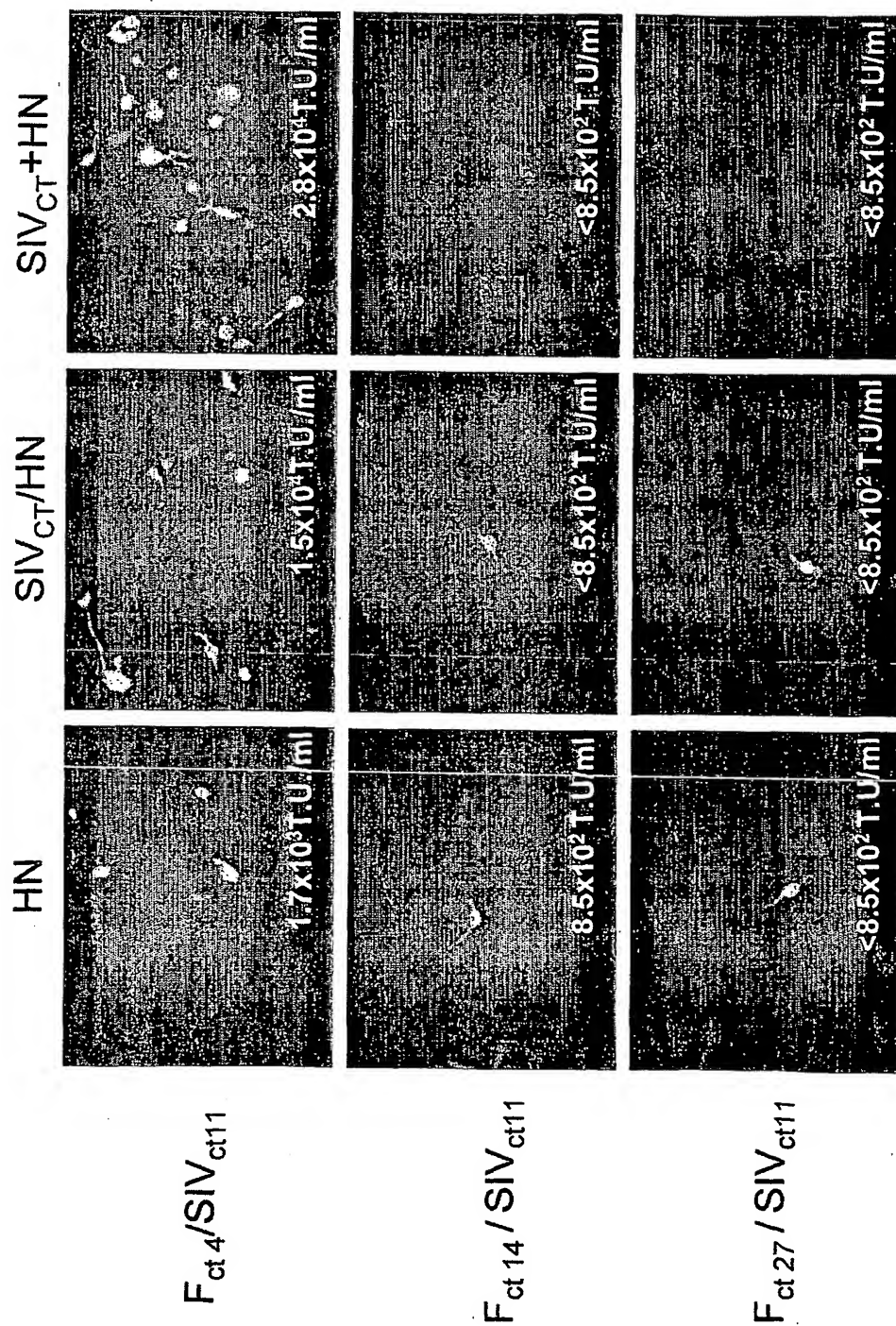
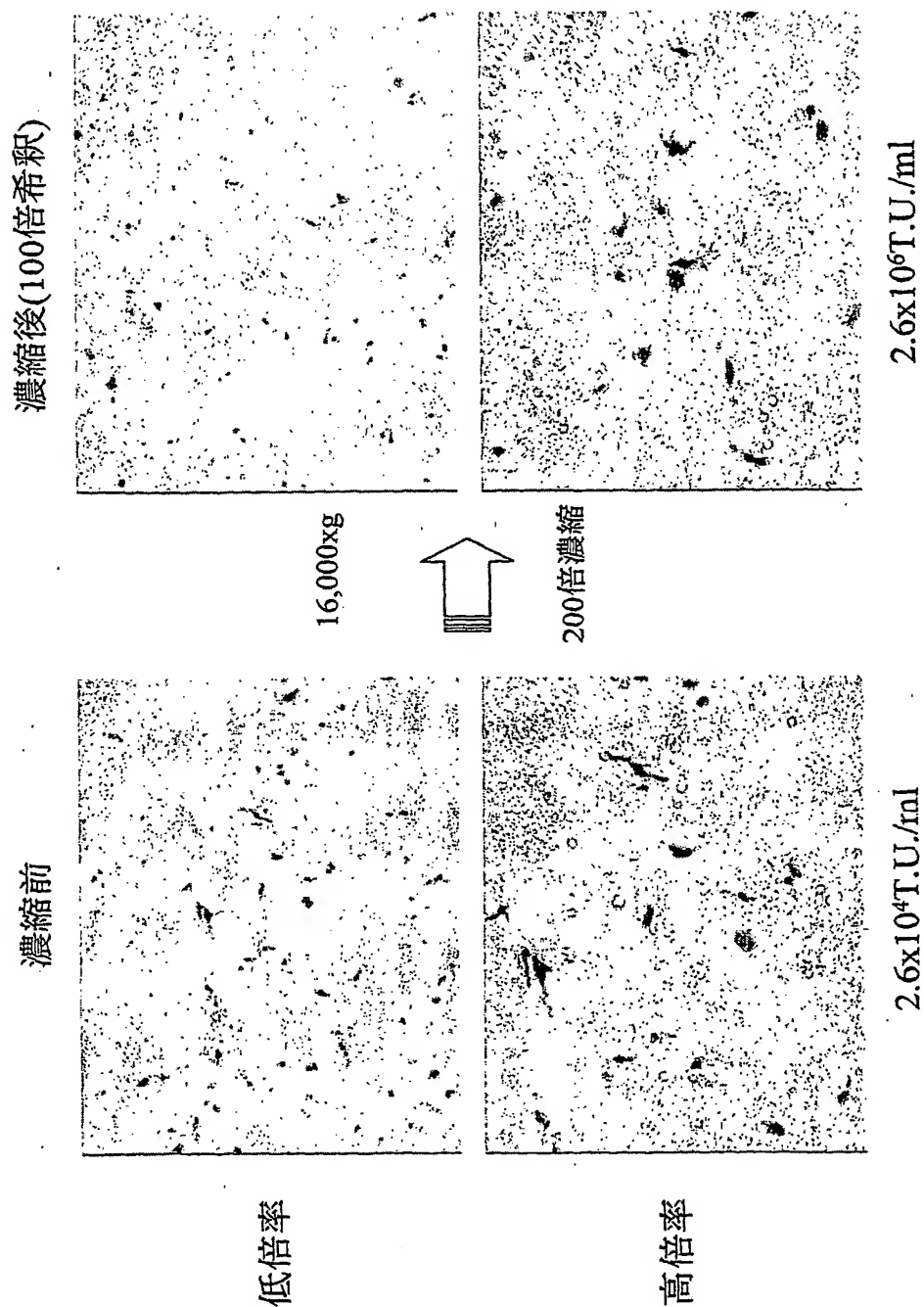


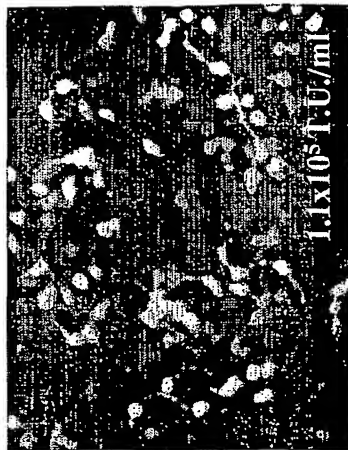
図 2 1



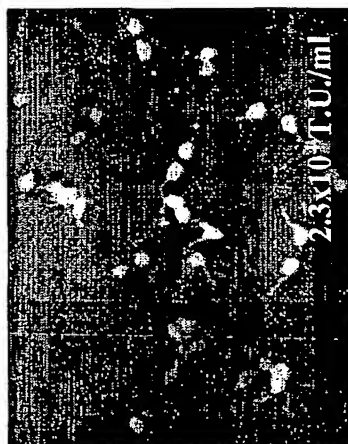
22 / 25

22

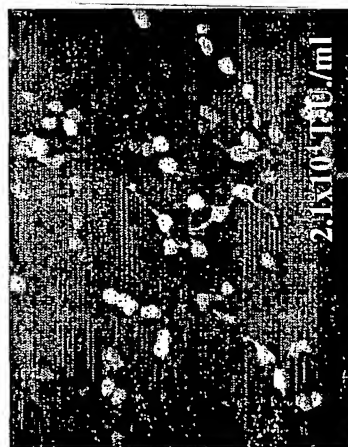
SIVct+HN



SIVct/HN



HN

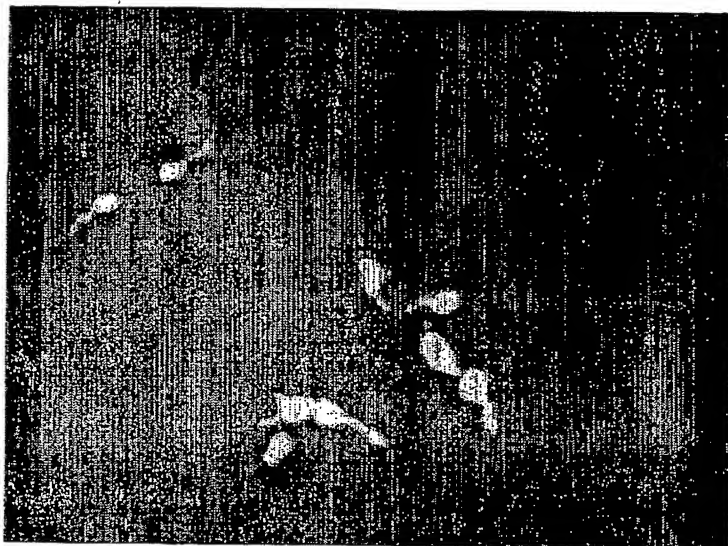


Eco env
F_{ct4}

cell:293T

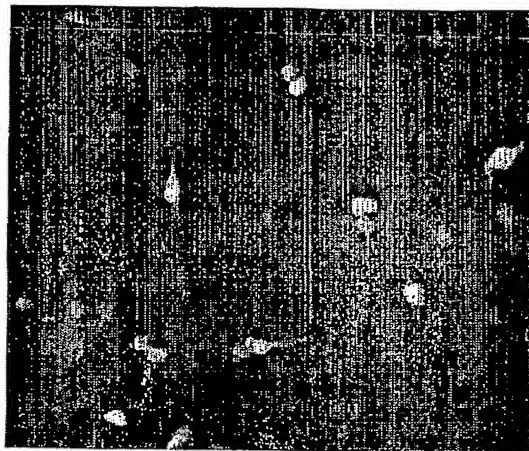
☒ 23

23 / 25

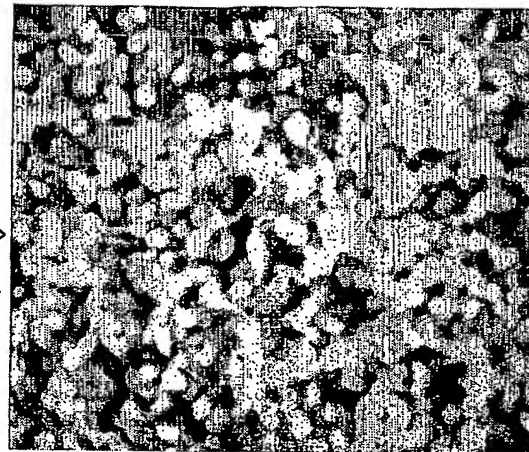


24 / 25

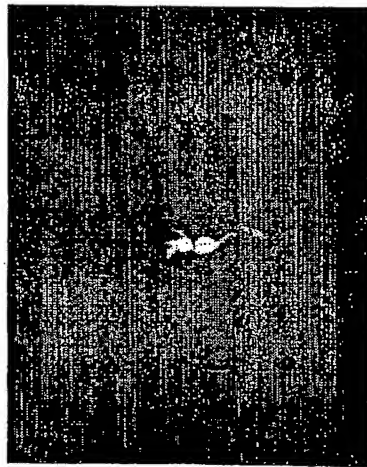
図 24



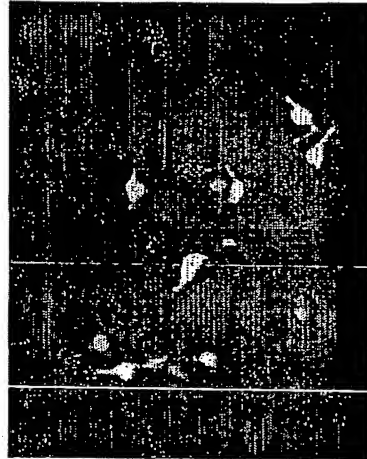
濃縮
⇒



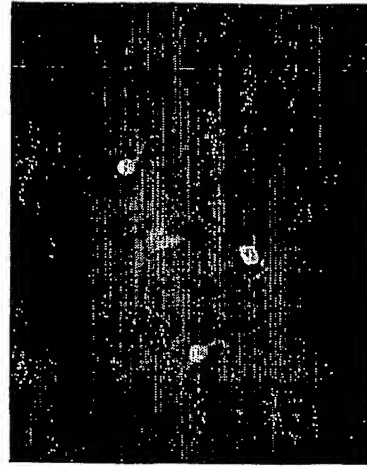
HA/HN



HA/HNectoSIVct



HA/HN+SIVct



ノイラミニダーゼ無添加

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research INC.

<120> Retrovirus vectors pseudotyped with hemagglutinating proteins

<130> D3-107PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000-169090

<151> 2000-06-01

<160> 49

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

2/26

<400> 1

gcagatctca accaggaggc gaggtgcat ttggg

36

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 2

gcgaattcta ctactgggtg ctgtaaagga gccaaa

36

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 3

3/26

atcgggaattc ttttattgta agatggattg gtttttaa

40

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 4

cgggatccgc ggccgcggat atggatctgt ggagatagag gaacatat

48

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 5

tcgagactag tgacttggtg agtaggctt

29

4/26

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 6

tcgaaagcct actcaccaag tcactactc

29

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 7

aatttctcga gcggccgca

19

<210> 8

<211> 19

5/26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 8

aatttgcggc cgctcgaga

19

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 9

gcggtacctg gatgggattt attactccga tagga

35

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

6/26

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 10

gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctatttctgc

40

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 11

gcgaattccc gtttgtgcta gggttcttag gcttct

36

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

7/26

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 12

tccccgcgga tatggatctg tggagataga ggaacatatc

40

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 13

gcgcggccgc ggatccgtcg acgcactttt taaaagaaaa ggga

44

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

8/26

<400> 14

gcgagctcta atgcaggcaa gtttattagc tttcta

36

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 15

ggaattcccg cggtagttat taatagtaat caattacggg

40

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 16

9/26

cgggatccgc ggccgcttac ttgtacagct cgtccatgcc

40

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 17

tatataagca gagctcgctg gcttgtaact cagtctctta

40

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 18

tatataagtg cagtacgctg gcttgtaact cagtctctta

40

10/26

<210> 19

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 19

tataaaaagc gaagccgctg gcttgtaact cagtctctta

40

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 20

gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctatttctgc

40

<210> 21

<211> 40

11/26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 21

cggggtacct caatattggc cattagccat attattcatt

40

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 22

agttacaagc cagcgagctc tgcttatata gacctccac

40

<210> 23

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

12/26

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 23

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaaag aaaagggagg actggatggg atttattact 60
ccgataggac gctggcttgt aactcagtct cttactagg 99

<210> 24

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized DNA sequence

<400> 24

gcgagctcta atgcaggcaa gtttattagc tttcta 36

<210> 25

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

13/26

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 25

tcgagatgtg gtctgagtta aaaatcagga gcaacgacgg aggtgaagga ccagacgcca 60
acgacccc 67

<210> 26

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 26

ccgggggtcg ttggcgtctg gtccttcacc tccgtcgttg ctccctgattt ttaactcaga 60
ccacatc 67

<210> 27

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

14/26

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 27

ccggggaaag ggggtgcaac acatccatat ccagccatct ctacctgttt atggacaga 59

<210> 28

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 28

accctctgtc cataaacagg tagagatggc tggatatgga tgtgttgac cccctttcc 59

<210> 29

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

15/26

synthesized sequence

<400> 29

gggttaggtg gttgctgatt ctctcattca cccagtggg

39

<210> 30

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 30

gatccccact gggatgaatga gagaatcagc aaccaccta

39

<210> 31

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

16/26

<400> 31

gagactcgag atgtggtctg agttaaaaat cagg

34

<210> 32

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 32

agaggtagac cagtacgagt cacgtttgcc cctatcacca tccctaaccc tctgtccata 60
aac 63

<210> 33

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 33

17/26

ccgctcgagc atgacagcat atatccagag a

31

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 34

atagtttagc ggccgctcat ctgatcttcg gctctaattg

40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 35

atagtttagc ggccgctcaa cggtcattctg gattacccat

40

18/26

<210> 36

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence.

<400> 36

atagtttagc ggccgctcac cttctgagtc tataaagcac

40

<210> 37

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 37

atagtttagc ggccgcctat ggagatagag gaacatatcc ctgcctaacc cttctgatct 60
tcggctctaa tgt

73

<210> 38

19/26

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 38

atagtttagc ggccgcctat ggagatagag gaacatatcc ctgcctaacc ctacgggtcat 60
ctggattacc cat 73

<210> 39

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 39

atagtttagc ggccgcctat ggagatagag gaacatatcc ctgcctaacc ctccttctga 60
gtctataaag cac 73

<210> 40

20/26

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 40

Trp Ser Glu Leu Lys Ile Arg Ser Asn Asp Gly Gly Glu Gly Pro Glu

1 5 10 15

Asp Ala Asn Asp Pro Arg Gly Lys Gly Val Gln His Ile His Ile Gln

20 25 30

Pro Ser Leu Pro Val Tyr Gly Gln Arg Val Arg Val Arg Trp Leu Leu

35 40 45

Ile Leu Ser Phe Thr Gln

50

<210> 41

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

21/26

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 41

Trp Ser Glu Leu Lys Ile Arg Ser Asn Asp Gly Gly Glu Gly Pro Glu
1 5 10 15

Asp Ala Asn Asp Pro Arg Gly Lys Gly Val Gln His Ile His Ile Gln
20 25 30

Pro Ser Leu Pro Val Tyr Gly Gln Arg Val Arg Val Arg Asp Gly Asp
35 40 45

Arg Gly Lys Arg Asp Ser
50

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

22/26

synthesized sequence

<400> 42

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg

1 5 10 15

<210> 43

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 43

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser

1 5 10 15

Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg

20 25

<210> 44

<211> 38

23/26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 44

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser

1

5

10

15

Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr

20

25

30

Leu Glu Pro Lys Ile Arg

35

<210> 45

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

24/26

<400> 45

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Arg

1 5 10 15

Val Arg Gln Gly Tyr Val Pro Leu Ser Pro

20 25

<210> 46

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 46

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser

1 5 10 15

Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Arg Val Arg Gln Gly Tyr Val

20 25 30

Pro Leu Ser Pro

25/26

35

<210> 47

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 47

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser

1 5 10 15

Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr

20 25 30

Leu Glu Pro Lys Ile Arg Arg Val Arg Gln Gly Tyr Val Pro Leu Ser

35 40 45

Pro

26/26

<210> 48

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 48

gagagcggcc gcccaaatg aaggcaaac tactg

35

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 49

gatgcggccg ctcagatgca tattctgcac

30

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12N5/10, A61K35/76, A61K48/00 // (C12N15/09, C12R1:92),
(C12N5/10, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12N5/10, A61K35/76, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T. HATZIOANNOU et al., "Incorporation of Fowl Plague Virus Hemagglutinin into Murine Leukemia Virus Particles and Analysis of the Infectivity of the Pseudotyped Retroviruses", J. Virol., (1998), Vol.72, No.6, pages 5313 to 5317	1-24
X	WO 99/13905 A (The Trustees of the University of Pennsylvania), 25 March, 1999 (25.03.99), & AU 9893994 A	1-24
A	J. DONG et al., "A Chimeric Avian Retrovirus Containing the Influenza Virus Hemagglutinin Gene Has an Expanded Host Range", J. Virol., (1992), Vol.66, No.12, pages 7374 to 7382	1-24
A	T. MORRISON et al., "Complementation between Avirulent Newcastle Disease Virus and a Fusion Protein Gene Expressed from a Retrovirus Vector: Requirements for Membrane Fusion", J. Virol., (1991), Vol.65, No.2, pages 813 to 822	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 August, 2001 (27.08.01)

Date of mailing of the international search report
04 September, 2001 (04.09.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04659

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Y. P. AGRAWAL et al., "Cell-cycle kinetics and VSV-G pseudotyped retrovirus-mediated gene transfer in blood-derived CD34 ⁺ cells", Exp. Hematology, (1996), Vol.24, pages 738 to 747	1-24

A. 発明の属する分野の (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N15/09、C12N5/10、A61K35/76、A61K48/00 // (C12N15/09、C12R1:92)、(C12N5/10、C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09、C12N5/10、A61K35/76、A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	T. HATZIOANNOU et al. Incorporation of Fowl Plague Virus Hemagglutinin into Murine Leukemia Virus Particles and Analysis of the Infectivity of the Pseudotyped Retroviruses. J. Virol., 1998, Vol. 72, No. 6, pp. 5313-5317.	1-24
X	WO 99/13905 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) A) 25. 3月. 1999 (25. 03. 99) & AU 9893994 A	1-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 08. 01

国際調査報告の発送日

04.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

木村 順子

4N

9641

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると思われる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. DONG et al. A Chimeric Avian Retrovirus Containing the Influenza Virus Hemagglutinin Gene Has an Expanded Host Range. J. Virol., 1992, Vol. 66, No. 12, pp. 7374-7382.	1-24
A	T. MORRISON et al. Complementation between Avirulent Newcastle Disease Virus and a Fusion Protein Gene Expressed from a Retrovirus Vector :Requirements for Membrane Fusion. J. Virol., 1991, Vol. 65, No. 2, pp. 813-822.	1-24
A	Y. P. AGRAWAL et al. Cell-cycle kinetics and VSV-G pseudotyped retrovirus-mediated gene transfer in blood-derived CD34 ⁺ cells. Exp. Hematology, 1996, Vol. 24, pp. 738-747.	1-24

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.